

**Analyse genetischer Läsionen im
Hodgkin-Lymphom und einem
Kombinationslymphom sowie Charakterisierung
humaner CD30-positiver B-Zellen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Stefanie Schneider
aus Bochum

Juni 2015

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter:

Prof. Dr. Ralf Küppers

2. Gutachter:

Prof. Dr. Daniel Engel

Vorsitzender des Prüfungsausschusses:

Prof. Dr. Perihan Nalbant

Tag der mündlichen Prüfung:

26. Oktober 2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 Die Entwicklung von B-Zellen	3
1.3 Die Keimzentrumsreaktion	6
1.4 Maligne Lymphome	10
1.4.1 Das Hodgkin-Lymphom	11
1.4.2 Das Mantelzell-Lymphom	16
1.4.3 Kombinationslymphome	16
1.5 CD58.....	18
1.6 Der CD30-Rezeptor	18
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	20
2 Material & Methoden	22
2.1 DNA-Arbeitstechniken	22
2.1.1 Isolierung genomischer DNA	22
2.1.2 Bestimmung der DNA-Konzentration	22
2.1.3 IgV-Gen-PCR-Analyse von HRS- und MCL-Zellen eines Kombinationslymphoms und von CD30 ⁺ B-Zellen	22
2.1.4 Mutationsanalyse verschiedener Gene des Kombinationslymphoms.....	25
2.1.4.1 TP53.....	26
2.1.4.2 TNFAIP3.....	28
2.1.4.3 NFKBIA	29
2.1.4.4 SOCS1	31
2.1.4.5 NOTCH1.....	32
2.1.5 Mutationsanalyse von CD58 von mikrodisezierten HRS-Zellen und cHL-Zelllinien	33
2.1.6 Quantitative real-time PCR	35
2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	35
2.1.8 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	36
2.1.9 Sequenzreaktion und Auswertung.....	36
2.1.10 Produktion von überhängenden Adenin-Enden	37
2.1.11 Ligation von DNA zur Klonierung	37
2.1.12 Hitzeschock-Transformation	37
2.1.13 Plasmidaufreinigung	38
2.2 Proteinarbeitstechniken	39
2.2.1 Isolierung humaner B-Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation	39
2.2.2 Anreicherung von humanen CD30 ⁺ B-Zellen mittels MACS	39

2.2.3	Phänotypische Analyse von CD30 ⁺ B-Zellen	40
2.2.4	Sortierung von CD30 ⁺ GC- und CD30 ⁺ Nicht-GC-B-Zellen für die IgV-Genanalyse .	41
2.2.5	Sortierung verschiedener B-Zellpopulationen für qRT-PCR und Western Blot.....	42
2.2.6	Western Blot	42
2.2.6.1	Proteinisolierung.....	42
2.2.6.2	SDS-PAGE.....	43
2.2.6.3	Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran.....	43
2.2.6.4	Immunologischer Nachweis von Proteinen mit Antikörper	43
2.3	RNA-Techniken	44
2.3.1	RNA Isolierung und cDNA-Synthese.....	44
2.4	Zellkultur	45
2.4.1	Verwendete Zelllinien	45
2.4.2	Kultivierung von Zellen	45
2.4.3	Zellzahlbestimmung.....	45
2.4.4	Durchflusszytometrische Analyse von cHL-Zelllinien.....	45
3	Ergebnisse	47
3.1	Suche nach Mutationen im CD58-Gen in HRS-Zellen des cHL.....	47
3.1.1	Mutationsanalyse von <i>CD58</i> in HL-Zelllinien.....	48
3.1.2	Proteinexpression von CD58 in cHL-Zelllinien	49
3.1.3	Mutationsanalyse von <i>CD58</i> in primären cHL-Fällen	51
3.2	Molekulare Pathogenese eines Kombinationslymphoms bestehend aus einem cHL und MCL	52
3.2.1	IgV-Genanalyse von HRS- und MCL-Zellen des Kombinationslymphoms	53
3.2.2	Suche nach gemeinsamen und separaten Mutationen in den HRS- und MCL-Zellen des Kombinationslymphoms.....	55
3.2.2.1	Mutationsanalyse von <i>TNFAIP3</i> und <i>NFKBIA</i>	55
3.2.2.2	Mutationsanalyse von <i>SOCS1</i>	57
3.2.2.3	Mutationsanalyse von <i>NOTCH1</i>	58
3.2.2.4	Mutationsanalyse von <i>TP53</i>	59
3.3	Charakterisierung von humanen CD30 ⁺ B-Zellen	62
3.3.1	Isolierung und Anreicherung von CD30 ⁺ B-Zellen aus Tonsillen.....	63
3.3.2	Phänotypische Charakterisierung von CD30 ⁺ B-Zellen.....	65
3.3.3	IgV-Genanalyse der CD30 ⁺ B-Zellen.....	68
3.3.4	Validierung der Genexpressionsprofile durch qRT-PCR und Western Blot.....	71
4	Diskussion.....	76
4.1	Suche nach <i>CD58</i> -Mutationen in den HRS-Zellen des cHL	76
4.1.1	Analyse von <i>CD58</i> in HL-Zelllinien	76
4.1.2	Mutationsanalyse von <i>CD58</i> in primären cHL-Fällen	77
4.2	Transformierende Ereignisse in einem klonal verwandten Kombinationslymphom bestehend aus einem cHL und MCL	80
4.3	Charakterisierung von humanen CD30 ⁺ B-Zellen	86

4.3.1	Phänotypische Analyse von CD30 ⁺ B-Zellen	87
4.3.2	IgV-Genanalyse von CD30 ⁺ B-Zellen	88
4.3.3	Validierung der Genexpressionsprofile von CD30 ⁺ B-Zellen.....	90
4.3.4	Schlussfolgerung der Analysen zur Charakterisierung von CD30 ⁺ B-Zellen	92
5	Zusammenfassung der Arbeit.....	95
6	Literaturverzeichnis	97
7	Anhang	108
7.1	Publikationen	108
7.2	Manuskript in Vorbereitung.....	108
7.3	Danksagung.....	109
7.4	Lebenslauf	110
7.5	Eidesstattliche Erklärung	112

Abkürzungsverzeichnis

ALCL	Anaplastisch-großzelliges Lymphom (engl. <i>anaplastic large-cell lymphoma</i>)
APC (als Farbstoff)	Allophycocyanin
APC (als Zelltyp)	Antigen-präsentierende Zelle (engl. <i>antigen presenting cell</i>)
BCR	B-Zell-Rezeptor (engl. <i>B cell receptor</i>)
BSA	Rinderserum-Albumin (engl. <i>Bovine serum albumin</i>)
C	konstante Region der Ig-Ketten (engl. <i>constant</i>)
CD	Differenzierungs- <i>cluster</i> (engl. <i>Cluster of Differentiation</i>)
cDNA	komplementäre DNA
CDR	Komplementarität-bestimmende Region (engl. <i>complementarity determining regions</i>)
CDS	kodierende Sequenz (engl. <i>coding sequenz</i>)
CH	konstante Region der schweren Ig-Kette
cHL	klassisches Hodgkin-Lymphom (engl. <i>classical</i>)
Ct	Schwellenwert-Zyklus (engl. <i>Cycle threshold</i>)
dd	H ₂ O zweifach destilliertes Wasser
DH	Diversitäts-Gensegment der schweren Ig-Kette
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Deoxy-Nukleotid-Triphosphate
EBV	Ebstein-Barr-Virus
eng.	englisch
et al.	et altera (lat. und andere)
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (engl. <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>)
FCS	Fötales Kälberserum
FDC	Follikuläre dendritische Zelle (engl. <i>follicular dendritic cell</i>)
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FR	Gerüstregion (engl. <i>framework regions</i>)
GC	Keimzentrum (engl. <i>germinal center</i>)
H	schwere Ig-Kette (engl. <i>heavy</i>)
HL	Hodgkin-Lymphom
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JH	Verbindungs-Gensegment der schweren Kette
JL	Verbindungs-Gensegment der leichten Kette
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	leichte Kette (engl. <i>light</i>)
MACS	magnetisch-aktivierte Zellsortierung (engl. <i>magnetic activated cell sorting</i>)
MCL	Mantelzell-Lymphom (engl. <i>mantle cell lymphoma</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Protein (Typ I und II) (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
N-Nukleotid	nicht-keimbahnkodiertes Nukleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase change reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PRR	mustererkennende Rezeptoren (engl. <i>pattern recognition receptor</i>)
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR
R/S	Verhältnis von Austausch (engl. <i>replacement</i>)- zu stillen (engl. <i>silent</i>) Mutationen
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)

RSS	Rekombinationssignalsequenzen (engl. <i>recombination signal sequences</i>)
RT	Raumtemperatur
SHM	somatische Hypermutation
TBST	engl. <i>Tris-buffered Saline and Tween 20</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
VH	variable Region der schweren Ig-Kette
VL	variable Region der leichten Ig-Kette
WGA	Gesamtgenomvervielfältigung (engl. <i>whole genome amplification</i>)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der schrittweisen VDJ-Rekombination des Ig-Schwerkettenlocus (A) und der Struktur eines Antikörpermoleküls (B).....	4
Abbildung 2: Darstellung der GC-Reaktion (Basso & Dalla-Favera, 2015).	9
Abbildung 3: Szenario der Entstehung klonal verwandter Kombinationslymphome (Küppers <i>et al.</i> , 2014).....	17
Abbildung 4: Deletion im CD58-Gen der cHL-Zelllinie KM-H2.....	49
Abbildung 5: Analyse der Proteinexpression von CD58 verschiedener cHL-Zelllinien.....	50
Abbildung 6: Nukleotidsequenz der identifizierten VH3-66-Umlagerung der analysierten HRS- und MCL-Zellen	55
Abbildung 7: Sequenzen der <i>TP53</i> -Analyse von HRS-, MCL- und CD3 ⁺ Nicht-Tumorzellen.....	61
Abbildung 8: Überprüfung der CD3-Depletion und CD30-Anreicherung	63
Abbildung 9: Sortierung von CD30 ⁺ GC- und CD30 ⁺ Nicht-GC-B-Zellen.....	64
Abbildung 10: Repräsentative Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung von CD30 ⁺ B-Zellen	66
Abbildung 11: Vergleich der Genexpression verschiedener Gene in unterschiedlichen CD30 ⁺ und CD30 ⁻ B-Zellpopulationen.....	74
Abbildung 12: MYC-Expression in CD30 ⁺ B-Zellen.....	75
Abbildung 13: Mögliche Szenarien für die Entwicklung des MCL und cHL in dem untersuchten Kombinationslymphom. Modifiziert nach (Schneider <i>et al.</i> , 2014).	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sequenzen der verwendeten Primer für die IgV-Genanalyse	25
Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Primer für die Mutationsanalyse von <i>TP53</i>	27
Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten Primer für die Mutationsanalyse von <i>TNFAIP3</i>	29
Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten Primer für die Mutationsanalyse von <i>NFKBIA</i>	31
Tabelle 5: Sequenzen der verwendeten Primer für die Mutationsanalyse von <i>SOCS1</i>	32
Tabelle 6: Sequenzen der verwendeten Primer für die Mutationsanalyse von <i>NOTCH1</i>	33
Tabelle 7: Sequenzen der verwendeten Primer für die Mutationsanalyse von <i>CD58</i>	34
Tabelle 8: Verwendete Antikörper und MicroBeads	40
Tabelle 9: Verwendete Antikörper für die phänotypische Analyse	41
Tabelle 10: Verwendete Antikörper	41
Tabelle 11: Verwendete Antikörper	42
Tabelle 12: Für den Western Blot verwendete Antikörper	44
Tabelle 13: Übersicht der Mutationsanalyse von <i>CD58</i> in cHL-Zelllinien	49
Tabelle 14: <i>CD58</i> -Mutationsanalyse von primären cHL-Fällen	52
Tabelle 15: IgV-Genanalyse der HRS- und MCL-Zellen	54
Tabelle 16: Zusammenfassung der Mutationsanalyse von <i>TNFAIP3</i> und <i>NFKBIA</i>	57
Tabelle 17: Mutationsanalyse von Exon 2 des <i>SOCS1</i> -Gens	57
Tabelle 18: Mutationsanalyse des <i>NOTCH1</i> -Gens im Kombinationslymphom	59
Tabelle 19: Sequenzergebnisse von Exon 5 des <i>TP53</i> -Gens	60
Tabelle 20: Phänotypische Charakterisierung von <i>CD30</i> ⁺ B-Zellen	67
Tabelle 21: IgV-Gen-Mutationsanalyse von <i>CD30</i> ⁺ GC- und <i>CD30</i> ⁺ Nicht-GC-B-Zellen	71

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Organismus zum einen vor körperfremden Pathogenen wie Viren, Bakterien, Pilzen, Parasiten oder anderen körperfremden Substanzen und kann zum anderen körpereigene Zellen zerstören, welche sich fehlerhaft verändert haben und zu Tumoren oder Autoimmunerkrankungen führen können. Für den Fall, dass Pathogene die epithelialen Oberflächen des Körpers überwinden und sich im Organismus vermehren, hat das Immunsystem die Aufgabe, diese zu erkennen und zu eliminieren. Klassischer Weise wird das Immunsystem unterteilt in das angeborene und in das adaptive Immunsystem. Zur Erkennung und Abwehr von Krankheitserregern besitzen beide Teile spezialisierte Zelltypen und ermöglichen zusammen die Bildung einer spezifischen Immunantwort gegenüber dem eingedrungenen Pathogen. Gleichzeitig wird ein immunologisches Gedächtnis gebildet, so dass bei wiederholtem Kontakt mit dem Pathogen eine schnelle und gezielte Immunreaktion erfolgen kann.

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Phase der Immunabwehr gegenüber eingedrungenen Pathogenen dar. Diese Phase dient der ersten Erkennung von Pathogenen und derer unspezifischen Abwehr, die durch unterschiedliche Zelltypen, ausgestattet mit mustererkennenden Rezeptoren (engl. *pattern recognition receptor*, PRR) und durch unspezifische Abwehrmechanismen erfolgt. Zum zellulären Teil des angeborenen Immunsystems zählen hauptsächlich Makrophagen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und neutrophile, basophile sowie eosinophile Granulozyten. Die Erkennung von Pathogenen erfolgt durch die PRRs auf der Oberfläche einiger Zellen. Sie binden an verschiedene Strukturen der Pathogene, wie z.B. Bestandteile der Bakterienzellwand, und können die Phagozytose dieser ermöglichen sowie aktivierende Signale in die Zelle weiterleiten. Makrophagen und dendritische Zellen sind in Geweben lokalisiert und fungieren als Antigen-präsentierende Zellen (engl. *antigen presenting cells*, APC). Sie präsentieren prozessiertes Antigen mit Hilfe von Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen vom Typ 2 (engl. *major histocompatibility complex 2*, MHCII) auf ihrer Zelloberfläche und ermöglichen somit über eine Aktivierung von T-Lymphozyten eine gezielte Immunantwort zu induzieren. Zu den humoralen Faktoren des angeborenen Immunsystems gehört z.B. auch das Komplementsystem, eine Kaskade von Proteinen, die hauptsächlich in der Leber synthetisiert werden und mit dem Blut zirkulieren. Die Proteine des Komplementsystems binden unspezifisch an Pathogene, markieren und opsonieren diese, oder zerstören ihre Zellmembran durch Porenbildung. Daneben löst es eine Reihe von Entzündungsreaktionen aus und einige Komplementproteine wirken als Chemokine, die weitere Phagozyten anlocken.

Nachdem das angeborene Immunsystem, das eingedrungene Pathogen erkannt hat und erste Schritte zur Abwehr eingeleitet wurden, wird mit Hilfe von APCs eine adaptive Immunantwort eingeleitet. Diese benötigt im Vergleich zum angeborenen Immunsystem mehrere Tage bevor sie aktiv an einer Immunantwort teilnehmen kann. Das adaptive Immunsystem setzt sich zum einen aus T-Lymphozyten zusammen, die eine Rolle in der zellgebundenen Immunität spielen und zum anderen aus B-Lymphozyten, die über Antikörper die humorale Immunantwort vermitteln. Diese antigenspezifischen B-Lymphozyten müssen jedoch erst aktiviert, selektiert und vermehrt werden, bevor sie zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen oder zu Gedächtnis-B-Zellen ausdifferenzieren. Dabei passt sich das adaptive Immunsystem spezifisch an neue oder veränderte Krankheitserreger an.

Eine große Anzahl Lymphozyten befindet sich im Blut, in der Lymphe und in den lymphatischen Organen, die in primäre und sekundäre lymphatische Organe unterschieden werden. Während in den primären lymphatischen Organen, Knochenmark und Thymus, die Bildung und Reifung der Lymphozyten stattfindet, besiedeln reife Lymphozyten die sekundären lymphatischen Organe, wie z.B. Lymphknoten und Milz, in denen die Immunreaktionen stattfinden.

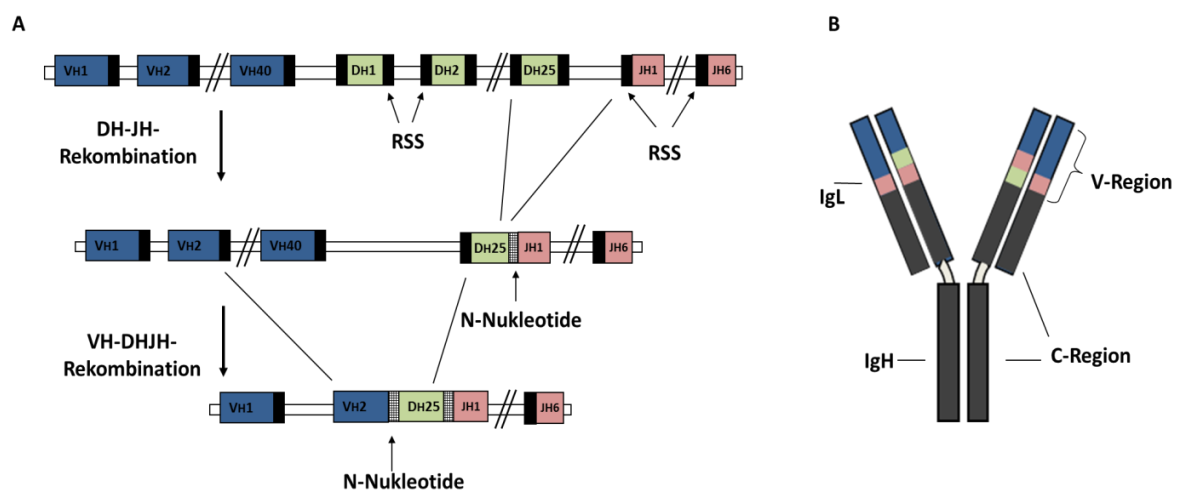
Lymphoide T-Vorläuferzellen werden im Knochenmark gebildet und wandern von dort zur Reifung in den Thymus. Reife T-Zellen können mit ihrem membrangebundenen T-Zell-Rezeptor Antigene erkennen, die ihnen von APCs mittels MHC-Molekülen präsentiert werden, wodurch die T-Zellen aktiviert werden. T-Zellen differenzieren sich zu unterschiedlichen Effektorzellen aus. Dabei unterscheidet man zwischen zytotoxischen T-Zellen, T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen. Die zytotoxischen T-Zellen können infizierte Zellen erkennen und eliminieren. Sie erhalten ihre zytotoxische Wirkung z.B. durch die Ausschüttung von Perforin/Granzyme oder Zytokinen sowie durch Bindung an Fas auf der Oberfläche der Zielzelle mit dem Fas-Liganden. Diese Mechanismen können Apoptose in den Zielzellen induzieren, wodurch diese vernichtet werden. T-Helferzellen zeichnen sich durch die Sekretion antiviraler und inflammatorischer Zytokine aus und sind in der Lage andere Immunzellen zu stimulieren. Die regulatorischen T-Zellen wirken entgegengesetzt und können u.a. durch die Ausschüttung suppressiver Zytokine, eine Immunreaktion hemmen. Sie haben eine wichtige Funktion bei der Vermittlung der Selbsttoleranz des Immunsystems und verhindern dadurch die Entstehung von Autoimmunkrankheiten.

B-Lymphozyten entstehen ebenfalls im Knochenmark. Nach der Reifung wandern B-Zellen aus dem Knochenmark ins Blut, ins Lymphgefäßsystem sowie in die sekundären lymphatischen Organe und sind zuständig für die humorale Immunantwort. Naive B-Zellen erkennen Antigene direkt mit Hilfe ihres membrangebundenen B-Zell-Rezeptors (engl. *B cell receptor*, BCR) und produzieren, nachdem Sie aktiviert wurden, Antikörper, die spezifisch

gegen dieses Antigen gerichtet sind. B-Zellen können sowohl T-Zell-abhängig, als auch T-Zell-unabhängig aktiviert werden. Bei den häufigeren T-Zell-abhängigen Immunreaktionen führt die Interaktion von antigenspezifischen B-Zellen mit kostimulierenden Signalen von antigenspezifischen T-Helferzellen und APCs zur Aktivierung von B-Zellen. Die B-Zelle proliferiert daraufhin und bildet ein sogenanntes Keimzentrum (engl. *germinal center*, GC), in dem verschiedene Differenzierungs- und Selektionsprozesse der B-Zelle stattfinden. Dies führt zum einen zur Bildung von Plasmazellen, die hochaffine Antikörper sezernieren, und zum anderen zur Entwicklung langlebiger Gedächtnis-B-Zellen. B-Zellen können aber auch T-Zell-unabhängig aktiviert werden. Man unterscheidet zwei Typen von T-Zell-unabhängigen Immunantworten. Bei der Typ-1-Immunantwort können bestimmte Antigene intrinsische Formen der Kostimulation in B-Zellen auslösen und diese aktivieren, z.B. durch Aktivierung des Lipopolysaccharid-Rezeptors. Bei der Typ-2-Immunantwort erfolgt die Aktivierung der B-Zelle durch eine starke Kreuzvernetzung der BCRs. Die Antigene weisen hierbei meist charakteristische repetitive Strukturen auf, wie sie z.B. bei Polysacchariden, in der Zellwand von Bakterien vorkommen. Es entstehen kurzlebige Plasmazellen die schnell große Mengen an IgM produzieren. Allerdings findet in der Regel kein Klassenwechsel statt und es werden auch keine Gedächtniszellen gebildet.

1.2 Die Entwicklung von B-Zellen

B-Lymphozyten entwickeln sich aus einer hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark. Dort durchlaufen die B-Vorläuferzellen verschiedene Differenzierungsstufen, bevor sie sich zu reifen B-Zellen entwickeln. Jede reife B-Zelle besitzt ein für sie charakteristisches und funktionelles BCR auf ihrer Oberfläche mit dem sie ein spezifisches Antigen erkennen und binden kann. Ohne funktionierenden BCR und dessen Überlebenssignale würde die B-Zelle durch Apoptose sterben. Der BCR wird zusammen aus einem Antikörper und den signalvermittelnden Molekülen CD79a und CD79b gebildet. Antikörper bestehen aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Polypeptidketten (engl. *heavy chain*, *H*, und *light chain*, *L*), welche kovalent miteinander verknüpft sind. Sowohl die leichten als auch die schweren Ketten besitzen eine carboxyterminale konstante (engl. *constant*, *C*) Region und eine aminoternale variable (engl. *variable*, *V*) Region (siehe Abbildung 1). Die C-Regionen der Schwereketten bestimmen den Isotyp des Antikörpers und bestehen aus einem C μ -, einem C δ -, einem C ϵ -, einem der zwei C α - oder- einem der vier C γ -Gene (Honjo, 1982). Die Isotypen sind für die unterschiedlichen Effektorfunktionen der Antikörper verantwortlich. Je nach Entwicklungsstadium der B-Zelle werden unterschiedliche Isotypen auf ihrer Oberfläche ausgeprägt. Die V-Region des Antikörpers ist für die spezifische Erkennung des Antigens verantwortlich und ist unterteilt in drei hypervariable Regionen (engl. *complementarity determining regions*, CDR) und in vier Gerüstregionen (engl. *framework regions*, FR). Die VH-Regionen werden von einem der 40 vorkommenden



(A) Gezeigt ist die schematische Darstellung der VDJ-Rekombination der schweren Ig-Kette. Im ersten Schritt, der DH-JH-Rekombination, wird ein DH-Segment an ein JH-Segment rekombiniert. Darauf folgt im nächsten Schritt die Rekombination eines VH-Segmentes an das zuvor entstandene DHJH-Segment. Eventuell zwischen den Gensegmenten eingebaute nicht keimbahnkodierte N-Nukleotide sind durch die schraffierten Bereiche gekennzeichnet. Die schwarzen Balken stellen die RSS dar. (B) Abgebildet ist ein Antikörpermolekül, bestehend aus zwei schweren (innen liegende) und zwei leichten (außen liegende) Ketten. Sowohl schwere als auch leichte Ketten besitzen eine variable (V-) Region und eine konstante (C-) Region. Die verwendete Farbkodierung der einzelnen Gensegmente ist identisch wie in Teil A der Abbildung.

4

Gensegmenten und ihren RSS ein (McBlane *et al.*, 1995). Die Enden der zwei rekombinierenden Gensegmente werden in einem Komplex nahe zusammen geführt und miteinander verbunden, wobei es zur Ausbildung einer Haarnadelstruktur kommt. Im Anschluss wird die Haarnadelstruktur an einer variablen Position wieder geöffnet, was meistens zu kurzen palindromischen Sequenzen (P-Nukleotide) führt, die zur Diversität der V-Region beitragen. An den Verbindungsstellen der umgelagerten Segmente werden einzelne Nukleotide abgebaut und einzelne nicht-keimbahnkodierte Nukleotide (N-Nukleotide) können zusätzlich durch das Enzym Terminale-Deoxynukleotidyl-Transferase eingefügt werden (Tonegawa, 1983). Durch dieses Abbauen und Einfügen einzelner Nukleotide kann es zu einer Verschiebung des Leserasters oder zur Erzeugung eines vorzeitigen Stopcodons kommen, so dass in ca. zwei Drittel der Fälle kein funktionierendes Protein entsteht. Eine solche unproduktive Rekombination führt dazu, dass die VDJ-Rekombination auf dem zweiten Schwerkettenlocus eingeleitet wird. Ist diese Umlagerung ebenfalls unproduktiv, stirbt die B-Zelle durch Apoptose (Rajewsky, 1996). Nach einer produktiven Umlagerung wird die schwere Kette synthetisiert und zusammen mit der aus den Proteinen VpreB und $\lambda 5$ bestehenden Ersatz-Leichtkette und den Signalmolekülen CD79a und CD79b exprimiert (Melchers *et al.*, 1995; Meffre *et al.*, 2000). Dieser Prä-BCR induziert Signale, die die Differenzierung in frühe Prä-B-Zellen einleitet und zusätzlich die Umlagerung des zweiten Allels unterbindet (allelische Exklusion). Die Prä-B-Zelle proliferiert und beginnt mit der Rekombination der Gene der leichten Kette (Rajewsky, 1996). Die Rekombination der V- und J-Gensegmente der leichten Kette erfolgt in den meisten Fällen zunächst auf dem Igk-Locus (Rajewsky, 1996; Bräuninger *et al.*, 2001). Ist die Rekombination auf beiden Igk-Genloci unproduktiv, wird der Igk-Locus durch das κ -deletierende Element inaktiviert und es besteht die Möglichkeit einer Umlagerung der Ig λ -Loci (Bräuninger *et al.*, 2001). Demzufolge prägt eine B-Zelle entweder κ - oder λ -Leichtketten aus, wobei im Durchschnitt ca. 60% der Zellen κ - und 40% der Zellen λ -Leichtketten exprimieren (Tonegawa, 1983; Alt *et al.*, 1992; Rajewsky, 1996). Nach erfolgreicher Rekombination der leichten Kette wird diese zusammen mit der schweren Kette als Teil des BCR-Komplexes exprimiert. Eine B-Zelle mit einem vollständigen und funktionierenden BCR auf ihrer Oberfläche wird nun als unreife B-Zelle bezeichnet. Unreife B-Zellen durchlaufen einen weiteren Selektionsprozess bevor sie zu einer reifen B-Zelle werden, indem sie auf Autoreaktivität hin überprüft werden. Bindet der exprimierte BCR an Autoantigene, kann eine erneute Umlagerung der leichten Kette eingeleitet werden (engl. *receptor editing*), so dass ein funktionierender, nicht-autoreaktiver BCR generiert wird. Ist dies nicht möglich wird die B-Zelle durch Anergie reaktionsunfähig gemacht oder sie wird durch Apoptose eliminiert (Goodnow *et al.*, 1988; Retter & Nemazee, 1998; Casellas *et al.*, 2001). B-Zellen mit nicht-autoreaktiven BCR können nun das Knochenmark als

antigenunerfahrene B-Zelle über das Blut verlassen und beginnen zwischen Blut und den sekundären lymphatischen Organen zu zirkulieren (Rajewsky, 1996). Diese naiven B-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche einen BCR vom Isotyp IgM und IgD.

1.3 Die Keimzentrumsreaktion

GCs sind besondere histologische Strukturen, die im Laufe der T-Zell-abhängigen Immunantwort, innerhalb der peripheren lymphatischen Organe entstehen. Naive B-Zellen zirkulieren durch das Blut, das Lymphgefäßsystem und durch sekundäre lymphatische Organe. Treffen Sie dabei auf ein Antigen, wandern sie an die Grenze der T-Zell-reichen Zonen des Lymphknotens und werden dort mit Hilfe von antigenspezifischen T-Helferzellen und APCs aktiviert. Wichtige Faktoren dabei sind CD40, ein Faktor aus der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor Familie, der von allen B-Zellen ausgeprägt wird, und sein Ligand CD154, der von aktivierten T-Helferzellen exprimiert wird. Die aktivierten B-Zellen beginnen zu proliferieren und zu differenzieren, so dass sich ein Teil dieser B-Zellen zu kurzlebigen Plasmablasten entwickeln, die Antikörper mit geringer Affinität sezernieren. Der andere Teil der aktivierten B-Zellen bildet das sogenannte GC (De Silva & Klein, 2015). GCs formieren sich aus stark proliferierenden B-Zellen in den primären Follikeln lymphatischer Gewebe, die hauptsächlich aus ruhenden naiven B-Zellen und follikulären dendritischen Zellen (engl. *follicular dendritic cells*, FDC), bestehen. Die eingewanderten B-Zellen interagieren dort mit den FDCs und eingewanderten antigenspezifischen T-Helferzellen, werden stimuliert, beginnen sich zu teilen und bilden einen sekundären Follikel (Rajewsky, 1996; De Silva & Klein, 2015). Als Folge der starken Proliferation, wird ein großer Teil der ruhenden follikulären B-Zellen, von den B-Zell-Blasten (Zentroblasten), an den Rand des Follikels verdrängt, wo sie die sogenannte Mantelzone bilden (Kroese *et al.*, 1990). Ein bis zwei Tage später lassen sich zwei histologisch sehr unterschiedliche Bestandteile des GCs unterscheiden, die sogenannte dunkle Zone und die helle Zone (siehe Abbildung 2) (De Silva & Klein, 2015). Die helle Zone setzt sich zusammen aus den eingewanderten B-Zellen (Zentrozyten), aus T-Helferzellen, FDCs und Makrophagen. Im Gegensatz dazu befinden sich in der dunklen Zone hauptsächlich dicht angeordnete, stark proliferierende Zentroblasten, innerhalb einem verbundenen Netzwerk CXCL12-positiver retikulärer Zellen, welche den FDCs der hellen Zone ähneln (De Silva & Klein, 2015). Die B-Zellen der dunklen und der hellen Zone des GC unterscheiden sich jeweils durch die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR5 (Allen *et al.*, 2004; Victora & Nussenzweig, 2012). Mit Hilfe des Markers CXCR4 und den Aktivierungsmarkern CD83 und CD86 können die B-Zellen der dunklen Zone ($CXCR4^{hi}CD83^{low}CD86^{low}$) von den B-Zellen der hellen Zone ($CXCR4^{low}CD83^{hi}CD86^{hi}$) unterschieden werden (Victora *et al.*, 2010; Victora & Nussenzweig, 2012).

Bei der Formierung des GC spielen viele verschiedene Faktoren eine wichtige Rolle, unter anderem die Expression von MYC (Calado *et al.*, 2012), *Interferon-regulatory factor 4* (IRF4), *Myocyte-specific enhancer factor 2B* (MEF2B) und *B cell lymphoma 6* (BCL6) (De Silva & Klein, 2015). Ein entscheidender Faktor für die Ausbildung eines GC ist der Faktor BCL6. Es handelt sich dabei um einen Transkriptionsfaktor, dessen erhöhte Transkription und Expression zur Folge hat, dass aktivierte B-Zellen in das Zentrum primärer Follikel wandern um dort das GC zu bilden (De Silva & Klein, 2015). So sind aktivierte B-Zellen von *BCL6*-knock-out Mäusen sind nicht in der Lage GC-Reaktion durchzuführen bzw. in primäre Follikel einzuwandern (Ye *et al.*, 1997; Kitano *et al.*, 2011).

In den GCs finden die Prozesse der somatischen Hypermutation (SHM), der Affinitätsreifung und des Klassenwechsel statt, die dazu führen, dass sich hochaffine Gedächtnis-B-Zellen und Antikörper-sezernierende Plasmazellen entwickeln (siehe Abbildung 2) (De Silva & Klein, 2015). Die GC-B-Zellen zirkulieren vor allem in, aber auch zwischen heller und dunkler Zone, was dazu führt, dass sie in einem Wechsel aus Mutation, Proliferation und Selektion ihre Affinität zum Antigen verbessern (Rajewsky, 1996; De Silva & Klein, 2015). Die SHM findet in der dunklen Zone des GC statt und sorgt im Zusammenspiel mit der anschließenden Selektion in der hellen Zone dafür, dass die Affinität des BCR für das jeweilige Antigen verbessert wird (siehe Abbildung 2) (Berek *et al.*, 1991; Jacob *et al.*, 1991; Küppers *et al.*, 1993). Dies geschieht hauptsächlich durch das Einfügen von Punktmutationen in die umgelagerten IgV-Gene des BCR, aber auch Duplikationen und Deletionen können eingefügt werden (Goossens *et al.*, 1998). Die Mutationsrate liegt dabei ca. bei 10^{-3} - 10^{-4} pro Basenpaar und Zellteilung (Kocks & Rajewsky, 1989). Die SHM ist abhängig von der Transkription und erfolgt hauptsächlich in einem Bereich von 1-2 kb, beginnend 3' nach dem IgV-Gen-Promotor und endend in dem Intron zwischen V- und C-Regionengen (Lebecque & Gearhart, 1990; Bachl *et al.*, 2001). Bei den zufällig eingeführten Nukleotidaustauschen handelt es sich häufiger um Transitionen als um Transversionen (Wagner & Neuberger, 1996). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass bestimmte Sequenzmotive von der SHM bevorzugt werden. Bei diesen sogenannten Mutations-*hotspots* handelt es sich um kurze Sequenzabschnitte, wie z.B. das RGYW-Motiv; R steht dabei für Adenin (A) oder Guanin (G), Y für Cytosin (C) oder Thymin (T) und W für A oder T (Rogozin & Kolchanov, 1992; Wagner & Neuberger, 1996). Essentiell für die SHM ist die Expression des Enzyms AID (*activation-induced cytidine deaminase*), welches Cytosin zu Uracil deaminiert (Muramatsu *et al.*, 2000; Revy *et al.*, 2000). Die Base Uracil ist kein Bestandteil der DNA und wird durch DNA-Reparaturmechanismen entfernt bzw. repariert. Durch die Verwendung von Polymerasen mit höherer Fehlerrate oder durch den Austausch der komplementären Base zu Cytosin bzw. Uracil, können Mutationen entstehen (Di Noia & Neuberger, 2007). Allerdings findet die SHM nicht nur in Ig-Genen statt, sie kann in geringerem Ausmaß auch in

anderen Genen, wie z.B. *BCL6*, Mutationen einführen (Pasqualucci *et al.*, 1998). Wurde durch die SHM die Affinität des BCR verbessert, werden diese B-Zellen in der hellen Zone des GC, mit Hilfe der FDCs und T-Helferzellen, positiv selektioniert und führen gegebenenfalls einen Klassenwechsel durch. Durch das Einfügen der Punktmutationen während der zyklischen Durchläufe von Proliferation, SHM- und Selektion, werden B-Zell-Klone mit intraklonaler Diversität gebildet. Die Mitglieder eines GC-B-Zell-Klons stammen dabei von derselben B-Zelle ab und besitzen somit identische V-Genumlagerungen. Allerdings unterscheiden sie sich in ihrem Mutationsmuster, das sowohl gemeinsame als auch individuelle Mutationen aufweist. Einige dieser GC-B-Zell-Klone differenzieren zu langlebigen Post-GC-B-Zellen und verlassen das GC (Kroese *et al.*, 1990; Küppers *et al.*, 1993). Aufgrund der Tatsache, dass die SHM auf das GC beschränkt ist, lassen sich GC-B-Zellen, Gedächtniszellen und Plasmazellen über ihre somatisch mutierten IgV-Gene definieren, während naive, GC-unerfahrene B-Zellen, keine mutierten IgV-Gene besitzen (Klein *et al.*, 1998b). Bei einem großen Teil der GC-B-Zellen, vermindern die im Zuge der SHM in den BCR eingefügten Mutationen jedoch die Affinität zum entsprechenden Antigen und die B-Zelle stirbt durch Apoptose.

Ebenfalls in der hellen Zone des GC durchlaufen einige GC-B-Zellen den sogenannten Klassenwechsel. Beim Klassenwechsel wird der Isotyp des exprimierten BCR gewechselt, wodurch es zu einer Änderung der Effektorfunktion, nicht aber der Spezifität des Antikörpers kommt (Manis *et al.*, 2002). Durch alternatives Spleißen exprimieren naive B-Zellen normalerweise IgM und IgD auf ihrer Oberfläche. Nach Antigenaktivierung wird oftmals die Ig-Klasse der schweren Kette des BCRs in IgG, IgA oder IgE geändert. Durch genetische Rekombination wird hierbei das C μ - und C δ -Gensegment durch ein C ϵ -, ein C α - oder ein C γ -Gensegment der C-Region der schweren Kette ersetzt. Diese Gensegmente sind 3' hinter den V-, D- und J-Gensegmenten auf Chromosom 14 lokalisiert. Beim Klassenwechsel wird das ursprünglich ausgeprägte IgH-Gen deletiert und durch ein weiter 3'-gelegendes IgH-Gen ersetzt. Im Intron vor jeder C-Region, mit Ausnahme von IgD, liegen die sogenannten Switch-Regionen. Dabei handelt es sich um GC-reiche Bereiche, die 5' von der C-Region lokalisiert sind. Durch Doppelstrangbrüche kommt es zwischen der Switch- μ -Region und der Switch-Region des jeweiligen C-Gens zu einer DNA-Rekombination. Das DNA-Fragment zwischen den beiden Switch-Regionen wird deletiert, und die Switch-Regionen werden durch nicht-homologes *end joining* so miteinander verknüpft, dass ein neues C-Gensegment hinter dem 3'-Ende der rekombinierten VDJ-Gensegmente liegt. Der Klassenwechsel ist ein irreversibler Prozess, der ebenso wie die SHM abhängig von dem Enzym AID ist (Muramatsu *et al.*, 2000; Revy *et al.*, 2000). Der Prozess des Klassenwechsels findet hauptsächlich im GC statt, kann in seltenen Fällen aber auch unabhängig von T-Zellen außerhalb des GCs erfolgen.

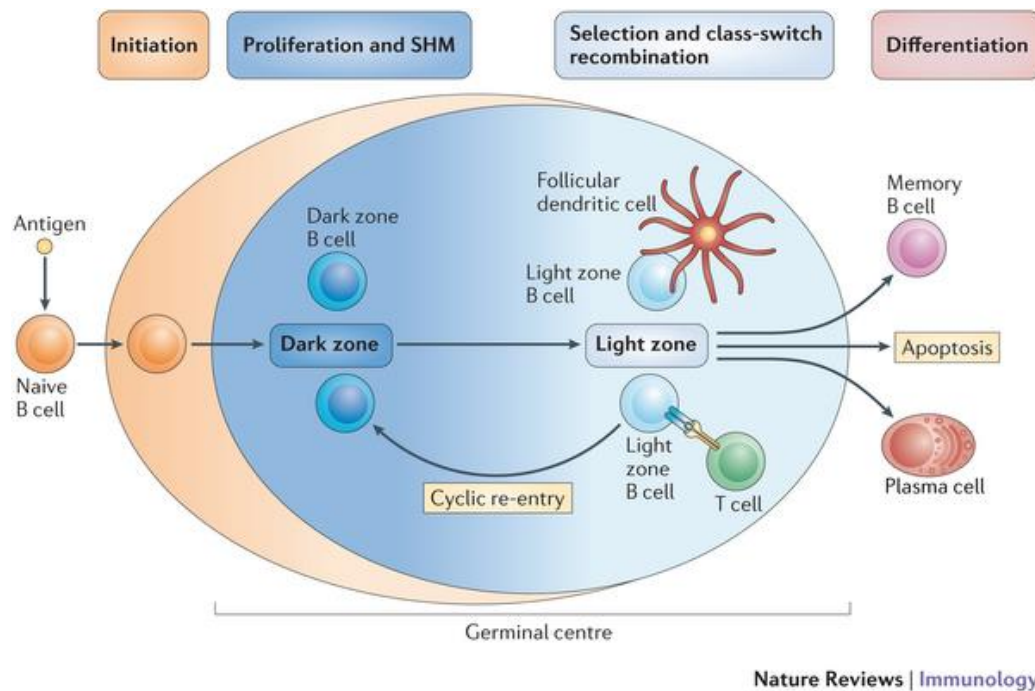


Abbildung 2: Darstellung der GC-Reaktion (Basso & Dalla-Favera, 2015).

Die Antigen-aktivierte B-Zelle wandert in den Follikel ein und bildet das GC. Hier finden die verschiedenen Reifungsprozesse der B-Zelle, SHM, Selektion und Klassenwechsel, statt. Das Ergebnis der GC-Reaktion ist die Bildung von Antikörper-produzierenden Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen, die eine erhöhte Affinität zum Antigen aufweisen. B-Zellen, deren Affinität nicht verbessert werden konnte, sterben durch Apoptose. Das GC setzt sich aus einer dunklen Zone mit stark proliferierenden B-Zellen und aus einer hellen Zone, die aus einer Mischung von B-Zellen, dendritischen Zellen, T-Zellen und Makrophagen besteht, zusammen. In der dunklen Zone des GC findet die Proliferation und SHM statt, während die B-Zellen in der hellen Zone selektioniert werden und dort der Klassenwechsel stattfindet. Die Reifung der B-Zelle erfolgt durch Rezirkulation der positiv selektionierten B-Zellen in die dunkle Zone mit erneuten Runden von Proliferation und SHM.

Auch der Ablauf und die Aufrechterhaltung des GCs erfolgt unter strikter Kontrolle verschiedener Regulatoren. Zum Beispiel ist bei der Aufrechterhaltung des GCs und für verschiedene entscheidende Funktionen der GC-B-Zellen die Expression des transkriptionellen Repressors BCL6 von essentieller Bedeutung (Basso & Dalla-Favera, 2010; 2015). So ist BCL6 z.B. wichtig für die Repression von Apoptose- und Zellzyklus hemmenden Faktoren, die Regulation auf genotoxischen Stress, der durch SHM und Klassenwechsel ausgelöst wird, und verhindert die frühzeitige Differenzierung zu Plasmazellen oder Gedächtnis-B-Zellen (Basso & Dalla-Favera, 2010; 2015). Die Differenzierung zu Plasmazellen wird durch eine verringerte Expression von BCL6 nach dem Klassenwechsel eingeleitet. Durch die Interaktion der positiv selektionierten B-Zellen mit T-Zellen wird NF- κ B durch CD40 stimuliert und dadurch IRF4 hochreguliert. Dies wiederum induziert PRDM1, das BLIMP1 (*B-lymphocyte-induced maturation protein 1*) kodiert, welches BCL6 hemmt. BCL6 wiederum reguliert negativ die Expression von PRDM1. Durch Aufhebung der negativen Regulation von PRDM1 durch BCL6 erfolgt die Differenzierung in Plasmazellen (Victoria & Nussenzweig, 2012; Basso & Dalla-Favera, 2015). Weitere wichtige Regulatoren sind unter anderem MYC, IRF4 und REL. MYC und REL werden z.B. benötigt

für die Rezirkulation der positiv selektionierten GC-B-Zellen zwischen heller und dunkler Zone, mit anschließender Durchführung einer neuen Runde von Proliferation, SHM und Affinitätsselektion. Somit spielen beide eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung des Keimzentrums. IRF4 hingegen wird nicht für die Aufrechterhaltung des GC benötigt, dafür aber für den Prozess des Ig-Klassenwechsels und für die Differenzierung in Plasmazellen (De Silva & Klein, 2015). Die starke Proliferation der Zentroblasten und die genetische Instabilität während der GC-Reaktion, macht sie zu einem kritischen Stadium der B-Zell-Entwicklung, aus dem sich unterschiedliche Lymphomarten, wie z.B. das Hodgkin-Lymphom (HL), entwickeln können (Küppers *et al.*, 1999).

1.4 Maligne Lymphome

Als Maligne Lymphome bezeichnet man eine heterogene Gruppe von Tumorerkrankungen des lymphatischen Systems. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterteilt diese in zwei große Gruppen, die HL und Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL). Das HL gehört zu den B-Zell-Lymphomen und stammt nur in seltenen Fällen von T-Zellen ab (Küppers *et al.*, 1994; Muschen *et al.*, 2000a; Seitz *et al.*, 2000). Es ist gekennzeichnet durch den histologischen Nachweis von ein- und mehrkernigen Riesenzellen, den sogenannten Hodgkin und Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen). Innerhalb der NHL werden drei unterschiedliche Kategorien definiert: indolente Lymphome (*low risk*), aggressive Lymphome (*intermediate risk*) und sehr aggressive Lymphome (*high risk*). Zu den indolenten Lymphomen gehören z.B. die chronische lymphatische Leukämie und das follikuläre Lymphom, die aggressiven Lymphome beinhalten unter anderem das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) und das Mantelzell-Lymphom (MCL), und zu der Gruppe der sehr aggressiven Lymphome gehört z.B. das Burkitt-Lymphom.

Die NHL entstammen entweder von B-Zellen, T-Zellen und in seltenen Fällen von NK-Zellen. Innerhalb der B- und T-Zell-Lymphome werden noch die Lymphome unterschieden, die von Vorläufer- oder reifen Zellen hervorgehen. Aufgrund ihrer histologischen und immunphänotypischen Merkmale, sowie häufig vorkommende gemeinsame genetische Läsionen, lassen sie sich in zahlreiche Subtypen unterteilen. Da es sich bei den NHLs um eine sehr heterogene Erkrankungsgruppe handelt, gibt es keine generelle Standardtherapie, sondern es stehen verschiedene Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung. Diese können je nach Stadium, Histologie und Aggressivität der Erkrankung, sowie vom Alter und Allgemeinbefinden des Patienten, sehr variieren.

Interessanterweise besitzen ungefähr 95% aller Lymphome einen B-Zellursprung, größtenteils von GC- oder Post-GC-B-Zellen (Küppers, 2005). Dies konnte durch den Nachweis somatisch mutierter Ig-Gene in den Tumorzellen gezeigt werden (Küppers *et al.*, 1999). In einigen Lymphomen ist der Prozess der SHM noch aktiv, was für die Abstammung von GC-B-Zellen spricht und auf eine Transformation der Ursprungszelle im GC hinweist.

Während der B-Zellentwicklung, insbesondere während der GC-Reaktion, finden mehrere Prozesse statt, die das Entstehen von transformierenden Ereignissen begünstigen und somit eine bedeutende Rolle in der Pathogenese von Lymphomen spielen. So können während der VDJ-Rekombination im Knochenmark, sowie der SHM oder dem Klassenwechsel im GC chromosomale Translokation entstehen. B-NHLs werden oft durch chromosomale Translokationen charakterisiert, die den IgV-Locus betreffen oder ihre Bruchpunkte in der Switch-Region oder in der Ziel-Region der SHM aufweisen (Küppers, 2005). Typischerweise gerät bei solchen Translokationen, das Onkogen unter Kontrolle des aktiven Ig-Locus, was zu einer deregulierten, konstitutiven Expression des translozierten Gens führt. Ein gutes Beispiel dafür ist die *CCND1/IgH*-Translokation im MCL, die als Nebenprodukt der VDJ-Rekombination entsteht (Stamatopoulos *et al.*, 1999; Jares & Campo, 2008).

Darüber hinaus können während der SHM auch Mutationen in nicht-Ig-Genen, wie z.B. *BCL6* und *CD95* (Pasqualucci *et al.*, 1998; Muschen *et al.*, 2000c), eingefügt werden. Diese Mutationen können in seltenen Fällen die Entwicklung von Lymphomen begünstigen. So werden in ca. 20% der (Post-)GC-B-Zell-Lymphome inaktivierende Mutationen in *CD95* gefunden, die die Lymphomzellen vor Apoptose schützen (Küppers, 2005). Aber auch die aberrante SHM kann zu einer deregulierten Expression betroffener Gene führen, indem Mutationen in die 5'-regulatorische Region der Gene eingeführt werden. Dies wurde für verschiedene Proto-Onkogene wie *MYC*, *BCL6* oder *PIM1* gezeigt (Pasqualucci *et al.*, 2001). Weitere Faktoren, die für die Pathogenese von Lymphomen eine wichtige Rolle spielen, sind Mutationen in Tumorsuppressorgenen wie z.B. in *TP53* oder *NFKBIA*, genomische Amplifikationen wie z.B. *REL*, die onkogenen Eigenschaften von Viren, wie z.B. das Epstein-Barr-Virus (EBV) oder aber der Einfluss des Tumormikromilieus (Küppers, 2005).

1.4.1 Das Hodgkin-Lymphom

Das HL zählt zu einem der am häufigsten vorkommenden Lymphome in der westlichen Welt, mit einer Inzidenz von drei Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Bezogen auf das Erkrankungsalter lassen sich zwei Häufigkeitsgipfel ausmachen. Dabei erkranken bevorzugt Erwachsene in einem Alter von 20 bis 30 Jahren, oder nach dem 65. Lebensjahr. Prinzipiell kann die Erkrankung aber auch in jedem anderen Alter auftreten. Im Allgemeinen erkranken Männer etwas häufiger als Frauen. Das erste Anzeichen für ein HL ist meistens eine schmerzlose periphere Lymphadenopathie am Hals oder hinter dem Brustbein (Mediastinum). Bei einem Teil der Patienten treten zusätzlich unspezifische Symptome wie Leistungsabfall, Müdigkeit, Fieber, Gewichtsverlust und Nachtschweiß auf (Yung & Linch, 2003). Die Prognose des HL hängt vom Tumorstadium, von der Histologie, vom Alter und Allgemeinbefinden des Patienten ab. Die Therapie erfolgt für die meisten Patienten mit einer Kombination aus Strahlen- und Chemotherapie. Wird das HL früh diagnostiziert und die Patienten früh therapiert liegt die Heilungsrate mittlerweile bei ungefähr 90% (Diehl *et al.*,

2004; Küppers *et al.*, 2012). Dennoch ist die allgemeine Lebenserwartung aufgrund von langfristigen therapiebedingten Nebenwirkungen reduziert (Ng *et al.*, 2002; Bhatia *et al.*, 2003). Derzeit werden alternative Therapieansätze, wie z.B. die Immuntherapie erforscht, die in Zukunft eine sinnvolle Ergänzung der etablierten Therapien darstellen könnten. Zu diesen Therapien gehört u.a. der Einsatz des Anti-CD30-Antikörpers Brentuximab Vedotin, der gekoppeltes Zytostatikum direkt in die Tumorzellen befördert. Bei Patienten, die ein Rezidiv erleiden oder die auf klassische Behandlungen nicht ansprechen, wird dieses Präparat bereits erfolgreich eingesetzt (Rothe *et al.*, 2012; Stathis & Younes, 2015).

Charakteristisch für das HL ist das Vorkommen von großen neoplastischen, ein- oder mehrkernigen HRS-Zellen. Ihr Nachweis erfolgt durch die histologische Untersuchung eines Lymphknotens und ist für die Diagnose eines HL erforderlich. Die HRS-Zellen liegen eingebettet inmitten eines inflammatorischen Mikromilieus, das sich u.a. aus T-Zellen, B-Zellen, Neutrophilen, Eosinophilen, Makrophagen und Mastzellen zusammensetzt. Normalerweise machen die HRS-Zellen nur ungefähr 0,1-2% der Tumormasse aus (Küppers *et al.*, 2012). Aufgrund morphologischer und immunphänotypischer Kriterien wird das HL unterteilt in das klassische HL (engl. *classic HL*, cHL), das ca. 95% aller HL ausmacht, und in das noduläre Lymphozyten-prädominante HL (NLPHL, ca. 5% aller HL). Das cHL wird anhand von Histologie und Phänotyp der Zellen weiter in vier Subtypen unterteilt: das nodulär-sklerosierende cHL (ca. 70% der cHL), das gemischtzellige cHL (20-25 %), das lymphozytenreiche cHL (5%) und das lymphozytenarme cHL (0,3%) (Matsuki & Younes, 2015).

HRS-Zellen besitzen einen sehr komplexen und ungewöhnlichen Immunphänotyp. Sie exprimieren typische Marker vieler hämatopoetischer Zellreihen. So können HRS-Zellen typische Marker von T-Zellen (CD3, NOTCH1, GATA3), von B-Zellen (PAX5, CD20), von dendritischen Zellen (CCL17), von NK-Zellen (ID2), von myeloiden Zellen (CSFR1) oder von Granulozyten (CD15) ausprägen. Immer exprimieren sie jedoch den Aktivierungsmarker CD30 (Küppers *et al.*, 2012). Aufgrund dieses ungewöhnlichen Immunphänotyps und ihrer Seltenheit im Tumorgewebe war der zelluläre Ursprung der HRS-Zellen lange Zeit nicht bekannt. Durch Mikrodissektion einzelner HRS-Zellen aus dem Gewebe und Einzelzellanalysen konnte ihr B-Zellursprung nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass HRS-Zellen umgelagerte IgV-Gene besitzen und innerhalb eines Tumors klonal miteinander verwandt sind. Durch den Nachweis von somatischen Mutationen in den umgelagerten IgV-Genen wurde gezeigt, dass die HRS-Zellen ihren Ursprung in GC-B-Zellen haben (Küppers *et al.*, 1994; Hummel *et al.*, 1996; Kanzler *et al.*, 1996b; Bräuninger *et al.*, 1997; Marafioti *et al.*, 1997; Irsch *et al.*, 1998; Vockerodt *et al.*, 1998; Bräuninger *et al.*, 1999). In ca. 25% der cHL-Fälle wurden inaktivierende Mutationen, wie Stopcodons, Insertionen oder Deletionen, die zur Verschiebung des Leserasters führen, in den ursprünglich funktionellen

IgV-Genen nachgewiesen (Küppers *et al.*, 1994; Kanzler *et al.*, 1996b; Marafioti *et al.*, 2000). Diese sogenannten „verkrüppelnden“ Mutationen verhindern die Ausprägung eines funktionellen BCR. Normalerweise würde dies im Rahmen der GC-Reaktion zum Zelltod durch Apoptose führen. Aufgrund der Tatsache, dass dies bei HRS-Zellen jedoch nicht der Fall ist, ist anzunehmen, dass sie von Prä-apoptotischen-GC-B-Zellen abstammen, die dem programmierten Zelltod durch vorangegangene transformierende Ereignisse entkommen konnten (Kanzler *et al.*, 1996b; Küppers *et al.*, 1998). In vielen cHL-Fällen mit verkrüppelten BCRs wurde auch EBV nachgewiesen (Bräuninger *et al.*, 2006). EBV kann durch die Expression von LMP2a die BCR-Aktivität imitieren, was das Überleben von HRS-Vorläuferzellen ohne funktionellen BCR im GC erklären könnte (Bechtel *et al.*, 2005; Chaganti *et al.*, 2005; Mancao & Hammerschmidt, 2007). Aufgrund der Expression von typischen T-Zell-Markern wurden Studien durchgeführt, in denen HRS-Zellen auf eine mögliche Abstammung von T-Zellen untersucht wurden. Eine Umlagerung des T-Zell-Rezeptors bei gleichzeitiger Abwesenheit des BCR war jedoch nur sehr selten (Muschen *et al.*, 2000a; Seitz *et al.*, 2000).

Die genaue Pathogenese des cHL ist weitestgehend noch nicht geklärt, aber es wurden bereits viele verschiedene Faktoren beschrieben, die einen Beitrag zur Pathogenese leisten. So sind in ungefähr 40% der cHL-Fälle die HRS-Zellen mit EBV infiziert. Es wurde auch beobachtet, dass die HRS-Zellen klonal mit EBV infiziert sind. Das lässt vermuten, dass schon die Vorläuferzelle infiziert ist und es sich somit um ein frühes Ereignis in der Pathogenese des cHL handelt (Anagnostopoulos *et al.*, 1989; Weiss *et al.*, 1989). Die Ausprägung der EBV-kodierten Proteine LMP1 und LMP2a scheint auch eine Rolle in der HL-Pathogenese zu spielen. So imitiert LMP1 einen aktivierten CD40-Rezeptor, der für das Überleben und die Differenzierung der B-Zellen im GC notwendig ist und LMP2a täuscht die Signale eines funktionierenden BCRs vor. Beide Faktoren tragen vermutlich dazu bei, HRS-Vorläuferzellen ohne funktionalen BCR vor der Apoptose zu bewahren (Bechtel *et al.*, 2005; Chaganti *et al.*, 2005; Mancao *et al.*, 2005; Mancao & Hammerschmidt, 2007).

Obwohl HRS-Zellen von reifen B-Zellen abstammen, konnten Genexpressionsanalysen zeigen, dass es eine allgemeine Herabregulierung der Expression von Genen gibt, die für B-Zellen spezifisch sind (Schwering *et al.*, 2003). So fehlen den HRS-Zellen zahlreiche B-Zell-spezifische Transkriptionsfaktoren wie z.B. OCT2, PU.1 und BOB1 (Stein *et al.*, 2001; Torlakovic *et al.*, 2001; Jundt *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu werden Regulatoren anderer Zellreihen, wie z.B. der Hauptregulator für die T-Zelldifferenzierung NOTCH1 und der NK-Zell-Faktor ID2, aberrant exprimiert (Renne *et al.*, 2006; Jundt *et al.*, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass NOTCH1 in der Lage ist, die Ausprägung B-Zell-spezifischer Gene zu unterdrücken und die Expression von Genen, die für andere Zelltypen charakteristisch sind, zu induzieren (Jundt *et al.*, 2008). So aktiviert NOTCH1 unter anderem die Expression von

GATA3 in HRS-Zellen (Stanelle *et al.*, 2010), wohingegen es die Ausprägung der B-Zell-Transkriptionsfaktoren E2A und EBF unterdrückt (Jundt *et al.*, 2008). ID2 hingegen inhibiert zusammen mit ABF-1 direkt den für die B-Zellentwicklung wichtigen Transkriptionsfaktor E2A (Mathas *et al.*, 2006). Zusätzlich scheint in HRS-Zellen die Expression von Faktoren der Polycomp Gruppe 1 und 2 zur Runterregulierung von B-Zell-spezifischen Genen und für die Expression von Markern anderer Zellreihen eine wichtige Rolle zu spielen (Raaphorst *et al.*, 2000; Dukers *et al.*, 2004). Aufgrund der Tatsache, dass HRS-Zellen von GC-B-Zellen abstammen und ohne funktionierenden BCR in Apoptose gehen würden, könnte der Verlust ihres ursprünglichen Phänotyps zu ihrer Rettung vor dem programmierten Zelltod beitragen. Der Verlust der B-Zell-Gene könnte also eine wichtige Rolle in der Pathogenese des cHL spielen.

Normalerweise unterliegt die Aktivierung von Signalwegen einer strengen Regulation. In HRS-Zellen gibt es jedoch Signalwege, wie z.B. den NF- κ B- und den JAK/STAT-Signalweg, die konstitutiv aktiviert sind und somit eine zentrale Bedeutung für ihr Überleben darstellen (Bargou *et al.*, 1997). Für die konstitutive Aktivierung des Signalweges spielt die Interaktion der HRS-Zellen mit dem umliegenden Mikromilieu eine wichtige Rolle. Verschiedene Rezeptoren auf den HRS-Zellen, u.a. CD40, CD30 und RANK, werden durch ihre Liganden, die von benachbarten Zellen ausgeprägt werden, aktiviert (Annunziata *et al.*, 2000; Fiumara *et al.*, 2001; Horie *et al.*, 2002). Aber auch inaktivierende Mutationen in Genen der NF- κ B-Inhibitoren *I κ B α* oder *I κ B ϵ* sind für die Aktivierung dieses Signalweges in 10-20% der cHL Fälle mitverantwortlich (Cabannes *et al.*, 1999; Jungnickel *et al.*, 2000; Emmerich *et al.*, 2003; Lake *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010). Weitere Gründe sind chromosomale Zugewinne von *REL* (30% der Fälle) und *NIK* (25%, *NF- κ B-inducing kinase*) sowie inaktivierende Mutationen des NF- κ B-Inhibitors *TNFAIP3* (40%, kodiert A20) (Joos *et al.*, 2002; Martin-Subero *et al.*, 2002; Saitoh *et al.*, 2008; Kato *et al.*, 2009; Schmitz *et al.*, 2009; Steidl *et al.*, 2010). Interessanterweise tritt die *TNFAIP3*-Mutation vorwiegend in EBV-negativen cHL-Fällen auf. In EBV-positiven Fällen kann das von EBV exprimierte Protein LMP1, durch Imitierung des CD40 Rezeptors, ebenfalls zur NF- κ B Aktivierung beitragen (Gires *et al.*, 1997; Kieser *et al.*, 1997). Mutationen in weiteren Regulatoren von NF- κ B, wie *BCL3*, *CYLD*, und *TRAF3*, können in vereinzelt Fällen auch mutiert sein (Martin-Subero *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2010; Otto *et al.*, 2012). Der JAK/STAT-Signalweg ist in den HRS-Zellen ebenfalls konstitutiv aktiv. In HRS-Zellen wurde eine konstitutive Ausprägung von STAT-Proteinen, wie STAT3, STAT5 und STAT6 nachgewiesen (Kube *et al.*, 2001; Hinz *et al.*, 2002; Skinnider *et al.*, 2002). Signale der Zytokine IL13 und IL21, die von den HRS-Zellen ausgeprägt werden, führen ebenfalls zu einer Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges (Skinnider *et al.*, 2002; Lamprecht *et al.*, 2008; Scheeren *et al.*, 2008). Zusätzlich wurde in 40% bzw. in 20% der cHL-Fälle inaktivierende Mutationen im

SOCS1- und PTPN1-Gen, beides negative Regulatoren der STAT-Aktivität, gefunden (Weniger *et al.*, 2006; Gunawardana *et al.*, 2014). In einer weiteren Studie konnten chromosomale Amplifikationen von 9p24, in der *JAK2* liegt, in den HRS-Zellen nachgewiesen werden. In seltenen Fällen ist *JAK2* auch in chromosomalen Translokationen beteiligt (Küppers, 2012). Weitere genetische Läsionen, die in HRS-Zellen nachgewiesen wurden, sind u.a. in Apoptose-Regulatoren wie *TP53* (8% der Fälle), *CD95* (6% der Fälle) und *MDM2* (60% der Fälle) (Küppers, 2012). Des Weiteren wurde gezeigt, dass in 7 von 10 cHL-Fällen inaktivierende Mutationen in *β -2-microglobulin (*B2M*)*, zu einem Verlust von MHC-I-Molekülen führen (Reichel *et al.*, 2015). Auch chromosomale Translokationen des IgH-Locus wurden in den HRS-Zellen von ca. 20% der cHL-Fälle gefunden. Einige von Ihnen betreffen die Onkogene *BCL1*, *BCL2*, *BCL3*, *BCL6*, *REL* und *MYC*, aber in den meisten Fällen sind die Translokationspartner unbekannt (Küppers *et al.*, 2012).

Die Interaktion von HRS-Zellen mit Zellen aus ihrem Mikromilieu ist von zentraler Bedeutung für ihr Überleben und hilft ihnen, sich vor Angriffen des Immunsystems, insbesondere von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen, zu schützen. Die HRS-Zellen sind umgeben von B-Zellen, Mastzellen, Makrophagen, Eosinophilen, Neutrophilen und vor allem T-Zellen, die durch Zytokine und Chemokine von den HRS-Zellen angezogen werden (Küppers *et al.*, 2012). Diese Nicht-Tumorzellen machen ungefähr 99% des Tumorgewebes aus. Den größten Anteil des Mikromilieus stellen dabei jedoch CD4⁺ T-Helferzellen mit einem Typ2-T-Helferzellen oder T-regulatorischen Phänotyp dar. Wie wichtig das Mikromilieu für die HRS-Zellen ist, zeigt z.B. die Tatsache, dass HRS-Zellen nicht im peripheren Blut vorkommen und es sehr schwer ist HRS-Zellen zu kultivieren (Küppers *et al.*, 2012). Einer der Gründe hierfür könnte die Abhängigkeit der konstitutiven Aktivität von NF- κ B sein. HRS-Zellen exprimieren die Rezeptoren CD30, CD40 und RANK, deren Stimulierung durch die Zellen des Mikromilieus zur Aktivierung des NF- κ B-Signalweges führt (Annunziata *et al.*, 2000; Fiumara *et al.*, 2001; Horie *et al.*, 2002). So prägen z.B. umliegende CD4⁺ T-Helferzellen den CD40-Liganden aus, während der CD30-Ligand von Mastzellen oder Eosinophilen exprimiert wird. Der enge Kontakt zwischen HRS-Zellen und den umliegenden CD4⁺ T-Helferzellen, wird vermittelt durch die Interaktion der Adhäsionsmoleküle CD58 und CD54, sowie der Rezeptoren CD40 und CD80, deren Bindungspartner von den rosettierenden T-Zellen ausgeprägt werden (Sanders *et al.*, 1988; Carbone *et al.*, 1995; Delabie *et al.*, 1995; Nozawa *et al.*, 1998). Eine wichtige Funktion des Mikromilieus der HRS-Zellen ist die Immunevasion, vor allem der Schutz vor zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen. HRS- und regulatorische T-Zellen sezernieren z.B. IL-10 und TGF- β , die beide zytotoxische T-Zellen inhibieren (Kadin *et al.*, 1990; Herbst *et al.*, 1996; Skinnider & Mak, 2002). Diese Hemmung der zytotoxischen T-Zellen wird durch die Sekretion von IL-7 und der Expression von Galectin-1 durch die HRS-Zellen verstärkt. IL-7

führt zu einer verstärkten Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Helferzellen in regulatorische T-Zellen und Galektin-1 führt zur Sekretion von Zytokinen, die typisch für Typ2-T-Helferzellen sind, und zu einer Expansion der Population regulatorischer T-Zellen im Mikromilieu der HRS-Zellen (Matsuki & Younes, 2015). Weitere Faktoren zum Schutz vor zytotoxischen T-Zellen umfassen die Expression von CD95- und PD1-Liganden auf den HRS-Zellen, die in zytotoxischen T-Zellen Apoptose einleiten oder deren Aktivität hemmen (Verbeke *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2008). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass inaktivierende Mutationen in *B2M* zu einem Verlust von MHCI-Molekülen führen und somit eine weitere Strategie der Immunevasion in HRS-Zellen darstellen (Reichel *et al.*, 2015). Viele weitere Faktoren, wie z.B. die Chemokine RANTES (CCL5), Eotaxin, MIP-3 α (CCL20) oder TARC (CCL17) und verschiedene Interleukine, die von HRS-Zellen oder anderen Zellen des Mikromilieus sezerniert oder ausgeprägt werden, prägen und formen das Mikromilieu auf verschiedenste Weise und nehmen positiven Einfluss auf das Überleben der HRS-Zellen (Matsuki & Younes, 2015).

1.4.2 Das Mantelzell-Lymphom

Das MCL gehört zu den aggressiven Lymphomen und macht ca. 4-10% aller NHL aus (Jares & Campo, 2008). Es tritt vorwiegend bei Männern im fortgeschrittenen Alter auf und hat aufgrund seines aggressiven Verlaufs eine sehr schlechte Prognose mit einer mittleren Überlebensrate von 5 - 7 Jahren (Jares & Campo, 2008; Perez-Galan *et al.*, 2011). Die Tumorzellen des MCL entwickeln sich aus den B-Lymphozyten, die in der Mantelzone des GC lokalisiert sind. Charakteristisch für das MCL ist die Translokation t(11;14), bei der das Cyclin D1-Gen (*CCND1*), während eines Fehlers der VDJ-Rekombination in den IgH-Locus transloziert wird. Dies führt zu einer Überexpression von Cyclin D1, das normalerweise nicht in B-Lymphozyten exprimiert wird (Stamatopoulos *et al.*, 1999; Jares & Campo, 2008). Oftmals lassen sich im MCL zusätzliche transformierende Ereignisse nachweisen. Dazu gehören z.B. Mutationen in Genen, die an der Zellzyklusregulierung und der DNA-Reparatur beteiligt sind, wie z.B. *ATM*, *NOTCH1* und *TP53* (Camacho *et al.*, 2002; Perez-Galan *et al.*, 2011; Kridel *et al.*, 2012). Darüber hinaus wurden in 15% der MCL-Fälle Mutationen in *TNFAIP3* nachgewiesen (Honma *et al.*, 2009).

1.4.3 Kombinationslymphome

Bei ungefähr 1-4% aller Lymphome handelt es sich um Kombinationslymphome (Küppers *et al.*, 2014). Kombinationslymphome sind sehr seltene Kombinationen von zwei unterschiedlichen Lymphomen in einem Patienten, die meistens gleichzeitig auftreten und im selben Organ lokalisiert sind. Es kann sich dabei um eine Kombination von zwei NHL oder einem NHL und einem HL handeln (Kim *et al.*, 1977; Jaffe *et al.*, 1994). Sehr häufig haben Kombinationslymphome einen B-Zellursprung. Durch Analyse der umgelagerten Ig-Gene in

Naive B cell

First shared transforming events

GC B cell

CLP

GC

HRS cell precursor

B-NHL cell

Separate additional transforming events

HRS cell

Dargestellt ist die Entwicklung klonal verwandter Kombinationslymphome, bestehend aus einem cHL und einem NHL. Die beiden Lymphome entwickeln sich aus einer möglicherweise bereits (Prä-)malignen Vorläuferzelle. Diese Vorläufer-B-Zelle absolviert im GC mehrere Runden Proliferation und somatische Hypermutation ihrer IgV-Gene. Während der GC-Reaktion finden weitere gemeinsame und individuelle transformierende Ereignisse statt, die zur Entwicklung in zwei unterschiedliche Lymphome führen. Die horizontalen Linien symbolisieren die IgV-Gene und die vertikalen Linien die IgV-Genmutationen. CLP = engl. *common lymphoma precursor*, gemeinsame Lymphom-Vorläuferzelle.

1.5 CD58

CD58, auch *lymphocyte function-associated antigen 3* (LFA-3) genannt, ist ein kostimulatorisches Molekül, das zur Superfamilie der Immunglobuline gehört. Es wird auf einer Vielzahl hämatopoetischer Zellen, vor allem auf APCs, ausgeprägt. Zusätzlich wird CD58 auch auf malignen Zellen, wie z.B. auf HRS-Zellen, exprimiert, wo es bedeutend ist für die Bindung rosettierender T-Zellen (Sanders *et al.*, 1988; Fromm *et al.*, 2006). CD58 ist ein stark glykosyliertes Zelladhäsionsmolekül, welches an den CD2-Rezeptor auf T-Lymphozyten und NK-Zellen bindet und dessen Interaktion verschiedene immunmodulierende Effekte auslöst (Springer *et al.*, 1987; Gollob & Ritz, 1996; Wang *et al.*, 1999; Bullens *et al.*, 2001). Vor allem für die Adhäsion und die Aktivierung von zytotoxischen T- und NK-Zellen spielt die Expression von CD58 eine bedeutende Rolle (Wang *et al.*, 1999). Dies wurde z.B. durch Analysen mit monoklonalen CD58-Antikörpern bestätigt. Es konnte eine verminderte Erkennung und Zytolyse von Melanomzellen durch zytotoxische T- und NK-Zellen durch die Verwendung der CD58-Antikörper gezeigt werden (Altomonte *et al.*, 1993). Darüber hinaus wurde kürzlich beschrieben, dass eine Inaktivierung von CD58 im DLBCL und in einigen T-Zell-Lymphomen eine bedeutende Rolle bei der Immunevasion zukommt (Challa-Malladi *et al.*, 2011; Palomero *et al.*, 2014). So wurde in ungefähr 20% der DLBCL-Fälle eine mono- oder biallelische genetische Läsion im CD58-Gen gefunden. In immunhistochemischen Analysen konnte aber in mehr als der Hälfte der analysierten DLBCL-Fälle keine CD58-Proteinexpression gezeigt werden (Challa-Malladi *et al.*, 2011). Das lässt vermuten, dass neben den Mutationen noch weitere Mechanismen für die Runterregulierung von CD58 verantwortlich sind. Darüber hinaus konnte in DLBCL-Zelllinien gezeigt werden, dass der Verlust von CD58 dazu beiträgt, dass die Zellen schlechter von NK-Zellen erkannt werden und somit die Zytolyse durch NK-Zellen vermindert ist (Challa-Malladi *et al.*, 2011).

1.6 Der CD30-Rezeptor

CD30, auch bekannt als TNFRSF8, ist ein glykosyliertes Transmembranprotein und Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie (Dürkop *et al.*, 1992; Falini *et al.*, 1995). Es handelt sich um ein Typ I-Transmembranprotein, dessen N-Terminus in den extrazellulären und C-Terminus in den intrazellulären Raum reicht. Der reife CD30-Rezeptor entsteht durch starke Glykosylierungen eines ca. 85 kDa großen Vorläuferproteins und hat eine molekulare Gesamtmasse von ca. 120 kDa (Falini *et al.*, 1995). Er besteht aus 595 Aminosäuren, wobei der extrazelluläre Anteil aus 365 Aminosäuren, der transmembrane Teil aus 24 Aminosäuren und die zytoplasmatische Domäne aus 188 Aminosäuren besteht (Dürkop *et al.*, 1992). Der extrazelluläre Teil des CD30-Rezeptors ist homolog zu den anderen Mitgliedern der TNF-Rezeptor-Superfamilie und weist sechs Cystein-reiche Motive auf. Die zytoplasmatische

Region hingegen hat keine Homologien zu den anderen Mitgliedern der Proteinfamilie. Trotz potentieller Phosphorylierungsstellen fehlt die katalytische Kinaseaktivität, so dass von Unterschieden im Signalmechanismus ausgegangen wird (Falini *et al.*, 1995; Horie & Watanabe, 1998). Neben der Membran-gebundenen Form gibt es auch eine lösliche Variante, die sCD30 (engl. *soluble*) genannt wird. Sie besteht nur aus dem extrazellulären Teil des CD30-Rezeptors, der durch eine proteolytische Spaltung abgetrennt wird (Falini *et al.*, 1995; Horie & Watanabe, 1998). Erhöhte sCD30-Konzentrationen werden im Serum von Patienten mit viralen Infektionen (HIV, Hepatitis B-Virus, EBV), einigen autoimmunen Erkrankungen und bei einigen Lymphomkrankungen gefunden und können somit einen Hinweis auf die Erkrankung geben und eine Verlaufskontrolle ermöglichen (Horie & Watanabe, 1998; Sotomayor *et al.*, 2014). Die Signalweiterleitung erfolgt über Signalmediatoren, wie beispielsweise den TRAF-Molekülen. So enthält die zytoplasmatische Region des CD30-Rezeptors Bindestellen für TRAF1, 2, 3 und 5 (Lee *et al.*, 1996; Aizawa *et al.*, 1997; Boucher *et al.*, 1997; Horie *et al.*, 1998). Die biologische Funktion von CD30 ist abhängig vom Zelltyp, Differenzierungsstadium und Transformationszustand der Zelle, sowie von der Anwesenheit anderer Stimuli (Grüss *et al.*, 1994). Der natürliche Ligand CD30L, wird auf verschiedenen hämatopoetischen Zellen, wie aktivierten T-Zellen, ruhenden B-Zellen und Granulozyten exprimiert. Die Effekte nach Aktivierung von CD30 durch seinen Liganden oder durch Kreuzvernetzung mit Antikörpern, sind pleiotrop, einschließlich Aktivierung, Proliferation, Differenzierung und Zelltod (Horie & Watanabe, 1998; Schneider & Hubinger, 2002). So wurde in murinen B-Zellen beschrieben, dass die Stimulierung des CD30-Rezeptors zur Proliferation und erhöhten Antikörperproduktion führte (Shanebeck *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu wurde in humanen Zellen gezeigt, dass die Expression von CD30 den CD40-induzierten Klassenwechsel und die Antikörperproduktion hemmt (Cerutti *et al.*, 1998). Ein weiteres Beispiel für seine duale Funktion wurde durch die Aktivierung von CD30 mittels eines Anti-CD30-Antikörpers gezeigt. In anaplastisch-großzelliges Lymphom (engl. *anaplastic large-cell lymphoma*, ALCL)-Zelllinien führt die Aktivierung von CD30 zu Apoptose, während derselbe Antikörper in HL-Zelllinien Proliferation auslöst (Mir *et al.*, 2000). Die Interaktion mit seinem Liganden führt zur Trimerisierung des Rezeptors, die für TNF-Rezeptoren charakteristisch ist, und kann zur Aktivierung des NF- κ B-Signalweges, sowie zur Aktivierung der MAP-Kinasen JNK, ERK und p38 führen (Schneider & Hubinger, 2002).

CD30 wird nicht von B-Lymphozyten im peripheren Blut ausgeprägt, sondern nur von einigen aktivierten B- und T-Zellen in lymphatischen Geweben. Bisher ist jedoch nur wenig über die Eigenschaften und den Differenzierungsstatus dieser seltenen Zellen bekannt. Bei den CD30⁺ B-Zellen handelt es sich um große, mononukleäre und proliferierende Zellen, die innerhalb von GCs und in extrafollikulären Regionen sekundärer lymphatischer Organe

angesiedelt sind (Stein *et al.*, 1985; Cattoretti *et al.*, 2006). Es wurde gezeigt, dass extrafollikuläre CD30⁺ B-Zellblasten MYC, PAX5, IRF4, ID2 und JUNB exprimieren. Ein Teil dieser Zellen prägt zusätzlich AID aus (Cattoretti *et al.*, 2006; Cattoretti, 2013). Die CD30⁺ B-Zellen innerhalb des GC wurden als stark proliferierend, IRF4⁺ und MYC⁺ beschrieben (Cattoretti, 2013). Darüber hinaus ist CD30 in EBV infizierten lymphoblastoiden Zelllinien, in einigen EBV- infizierten B-Zellen infektiöser Mononukleose, in CD4⁺ T-Zellen, die mit HIV infiziert sind und auf aktivierten Zellen verschiedener Autoimmunkrankheiten, ausgeprägt (Tsitsikov *et al.*, 1997; Kurth *et al.*, 2000; Sotomayor *et al.*, 2014).

Die Expression von CD30 ist auch charakteristisch für die Tumorzellen des cHL und ALCL, sowie für einen Teil der DLBCL-Fälle (Stein *et al.*, 1985; Hu *et al.*, 2013; Sotomayor *et al.*, 2014). Da die Tumorzellen des cHL von CD30L-exprimierenden Zellen umgeben sind, trägt das CD30-Signal vermutlich zur Deregulierung von Signalwegen im cHL bei, beispielsweise die Aktivierung von NF-κB. Die CD30-Expression von Tumorzellen ist aber nicht nur wichtig für die Pathologie und Diagnostik dieser Tumoren, sondern eröffnet auch neue Möglichkeiten zur Behandlung. So wird der Anti-CD30-Antikörper Brentuximab Vedotin, der gekoppeltes Zytostatikum direkt in die CD30⁺ Tumorzellen befördert, seit einiger Zeit erfolgreich in klinischen Studien zur Behandlung von CD30⁺ Lymphomen eingesetzt (Rothe *et al.*, 2012; Stathis & Younes, 2015).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Trotz der Tatsache, dass in den letzten Jahren bereits viele Faktoren und Mechanismen, die einen Beitrag zur Lymphomentstehung des cHLs leisten beschrieben wurden, ist die genaue Pathogenese und Biologie des cHLs noch weitestgehend unbekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es neue Aspekte der cHL-Pathogenese aufzuklären, indem nach möglichen Mutationen im CD58-Gen in den HRS-Zellen des cHLs gesucht und zusätzlich ein Kombinationslymphom analysiert werden sollte.

Mutationen des CD58-Gens wurden erst kürzlich in einigen cHL-Zelllinien identifiziert (Giefing *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2014) und inaktivierende CD58-Mutationen in anderen Lymphomen beschrieben, in denen sie eine bedeutende Rolle bei der Immunevasion darstellen (Challa-Malladi *et al.*, 2011; Palomero *et al.*, 2014). Der Mechanismus der Immunevasion ist auch im cHL stark ausgeprägt und somit sollten die gefundenen CD58-Mutationen der cHL-Zelllinien bestätigt, die Auswirkung dieser Mutationen auf die Proteinausprägung analysiert und zusätzlich primäre cHL-Fälle bezüglich inaktivierender Mutationen im CD58-Gen untersucht werden.

In einem weiteren Projekt sollte mittels IgV-Gen-PCR die klonale Verwandtschaft eines Kombinationslymphoms, das aus einem cHL und MCL besteht, untersucht werden. Des Weiteren sollten Untersuchungen zu gemeinsamen und unterschiedlichen transformierenden Ereignissen zwischen den beteiligten Lymphomen durchgeführt werden. Dafür sollte nach

Mutationen in verschiedenen Genen, die oft in diesen Lymphomtypen mutiert sind, gesucht werden. Diese Analysen sollten einen Einblick in die Pathogenese dieser Lymphome verschaffen und helfen die Mehrschrittpathogenese in der Lymphomentstehung besser zu verstehen.

In einem dritten Teilprojekt dieser Arbeit sollten humane CD30⁺ B-Zellen aus tonsillärem Gewebe isoliert und charakterisiert werden. Über die Herkunft, Eigenschaften und Differenzierungsstand dieser sehr seltenen CD30-exprimierenden B-Zellen ist bisher nur wenig bekannt. Zusätzlich sollte analysiert werden, ob es einen Zusammenhang zwischen den normalen CD30⁺ B-Zellen und den HRS-Zellen des cHL gibt, da die HRS-Zellen des cHLs immer positiv für CD30 sind. So sollten im Rahmen dieser Arbeit ergänzend zu den bereits von Dr. Enrico Tiacci durchgeführten Genexpressionsanalysen die CD30⁺ B-Zellen mittels Durchflusszytometrie und IgV-Gen-PCR-Analysen charakterisiert werden und die differentielle Ausprägung ausgewählter Gene, die in den Genexpressionsprofilen identifiziert worden sind, durch qRT-PCR und Western Blot-Analyse validiert werden.

2 Material & Methoden

2.1 DNA-Arbeitstechniken

2.1.1 Isolierung genomischer DNA

Für die Gewinnung genomischer DNA aus Zelllinien oder Zellsuspensionen wurden Zellmengen zwischen $250 - 1 \times 10^6$ Zellen, nach dem Prinzip der Proteinaussalzung und Alkoholfällung, isoliert. Dazu wurde das *Gentra PureGene Kit* oder das *DNeasy Blood and Tissue Kit* (beides Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet.

2.1.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

DNA-Konzentrationen wurden entweder quantitativ oder semiquantitativ durchgeführt. Die quantitative Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe eines Nanodrop ND-1000 Mikrovolumenspektrometers (Thermo Scientific, Wilmington, USA). Dazu wurden die DNA-Proben um den Faktor 1:100 verdünnt und gegen bi-destilliertes, Nuklease-freies H₂O gemessen. Die Konzentration der DNA wird unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

$$A = c \cdot d \cdot \epsilon$$

A: Absorption, c: DNA-Konzentration, d: Schichtdicke der Küvette,

ϵ : Extinktionskoeffizient doppelsträngiger DNA bei 260 nm.

Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht eine Absorption von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml bezogen auf doppelsträngige DNA. Die Reinheit der extrahierten DNA wird durch die Bildung des Quotienten der Extinktion bei 260 und 280 nm bestimmt. Hinreichend reine DNA entspricht ungefähr einem Quotienten von 1,8 oder größer.

Die semiquantitative DNA-Bestimmung wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurde ein geringes definiertes Volumen der Probe neben einem definierten Volumen eines Größenmarkers (z.B. *Low DNA Mass Ladder*, Life Technologies, Darmstadt) auf ein Agarosegel aufgetragen. Der Marker zeigt die Intensität verschiedener DNA-Mengen an, die man mit der Intensität der Probe vergleicht und so die DNA-Konzentration der Probe abschätzt.

2.1.3 IgV-Gen-PCR-Analyse von HRS- und MCL-Zellen eines Kombinationslymphoms und von CD30⁺ B-Zellen

Zur Bestimmung der klonalen Verwandtschaft des cHL und MCL wurden deren V-Genumlagerungen mittels Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert. Dazu wurden die genauen PCR-Bedingungen zunächst mit sortierten

Einzelzellen monoklonaler Zelllinien, deren V-Genumlagerungen bekannt waren, etabliert. Für die Durchführung der etablierten PCR, wurden die Zellen des cHL mittels Laser-Mikrodissektion zu Proben mit jeweils zwei Zellen und die Zellen des MCLs zu jeweils zehn Zellen pro Probe isoliert. Die Laser-mikrodissektierten Zellen, die für diese und auch alle anderen beschriebenen PCRs in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden zuvor von Markus Schneider isoliert. Für die IgV-Gen-PCR der CD30⁺ B-Zellen wurden zuvor 2x 1000 CD30⁺ GC-B-Zellen und 2x 1000 CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen isoliert (siehe 2.2.4). Die IgV-Gen-PCR erfolgte über zwei Runden, durch eine sogenannte *seminested* PCR. Es wurden Oligonukleotide (engl. *primer*) verwendet, die am 5'-Ende des V-Gensegmentes binden, kombiniert mit Primern die am 3'-Ende des J-Gensegmentes binden. In der ersten Runde wurde die PCR als Multiplex-PCR durchgeführt. Das bedeutet, es wurde eine Kombination aus familienspezifischen VHL-Primern und 3'-JH-Primern verwendet. Die IgV-Gene sind in sechs Familien zusammengefasst basierend auf einer Sequenzhomologie von mindestens 80%. Die VHL-Primer binden an die Leitpeptidsequenz der IgV-Gene der schweren Kette und sind so gestaltet, dass sie (fast) alle IgV-Gene einer Familie erkennen (Tabelle 1). In einer zweiten PCR wurden die voramplifizierten DNA-Fragmente in einzelnen PCR-Reaktionen mit den gleichen VHL-Primern und einer Mischung aus 5'-JH-Primern weiter vervielfältigt. Die Verwendung der eingerückten 5'-JH-Primer, die weiter innerhalb des J-Gensegmentes lokalisiert sind als die 3'-JH-Primer der ersten Runde (engl. *seminested* PCR), erhöht die Spezifität der PCR, da eine gleichzeitige Amplifizierung von unspezifischen Nebenprodukten überwiegend verhindert wird. Im ersten Schritt wurden die zellulären Proteine in den Zellproben beider Lymphomarten und in den Proben der CD30⁺ B-Zellen mit 1 µl Proteinase K (18 mg/ml *PCR grade*, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) versetzt, bei 55°C für 3 Stunden verdaut und das Enzym durch eine 8 minütige Inkubation bei 95°C inaktiviert. Es folgte die Zugabe weiterer PCR-Komponenten wie dNTPs, Puffer, Primer und Wasser (siehe Abschnitt PCR-Protokolle und Programme). Sowohl für die PCR-Ansätze in der ersten Runde als auch in der zweiten Runde wurde *Expand High Fidelity™*, *DNA polymerase mix* (Roche Diagnostics) eingesetzt. Dabei wurde die Erstrunden-PCR mit einem *hotstart* begonnen. Bei der PCR der CD30⁺ B-Zellen wurde sowohl in der ersten als auch in der zweiten Runde ein *hotstart* durchgeführt. Das bedeutet, dass der PCR-Ansatz zunächst 5 min bei 95°C denaturiert wird, bevor die Polymerase hinzugegeben und die PCR gestartet wird. Ein µl der Erstrunden-PCR diente im Anschluss als Amplifizierungsvorlage (engl. *template*) für die zweite Runde. Um Kondensierungen und Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Proben der ersten Runde mit Mineralöl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) überschichtet. Zur positiven Kontrolle wurden in der ersten Runde Proben von sortierten Einzelzellen und/oder Ansätze von zehn Zellen, die von monoklonalen Zelllinien mit bekannter V-Genumlagerung stammen, als *template* verwendet. Als Negativkontrolle

dienten zellfreie Pufferkontrollen. Alle Kontrollen der ersten Runde wurden mit in die zweite Runde überführt. Zusätzlich diente DNA aus monoklonalen Zelllinien mit bekannter V-Genumlagerung als positive Kontrolle für die zweite Runde. Reaktionsansätze ohne DNA, aber mit Wasser versehen, dienten als Zweitrundennegativkontrolle.

PCR-Protokoll für die 1. Runde

PCR-Ansatz (50 µl)

2,5 µl dNTPs (2 mM je dNTP)

3 µl 10x PCR-Puffer ohne MgCl₂ (*Expand High Fidelity*TM, Roche Diagnostics)

6 µl Primer-Mix 1. Runde (1 µM)

4 µl MgCl₂ (25 mM)

13 µl H₂O

+21 µl Zellen und Proteinase K in 1x PCR-Puffer

+0,5 µl DNA-Polymerase-Mix (*Expand High Fidelity*TM, Roche Diagnostics)

1. Runden Primer-Mix (Endkonzentration je Primer 1 µM)

VHL1, VHL2, VHL3, VHL3.2, VHL4, VHL5, VHL6, 3`JH1, 2, 4, 5, 3`JH3 und 3`JH6, versetzt mit 10 mM Tris-Puffer

PCR-Programm 1. Runde

95°C 5 min, 68°C Pause (Enzymzugabe), 72°C 1 min, 29/34 Zyklen (95°C 50 s, 61°C 30 s und 72°C 60 s), 72°C 5 min, 15°C Pause

PCR-Protokoll für die 2. Runde

PCR-Ansatz (50 µl)

5 µl dNTPs (2 mM je dNTP)

5 µl 10x PCR-Puffer ohne MgCl₂ (*Expand High Fidelity*TM, Roche Diagnostics)

2,5 µl familienspezifischer VHL Primer (2,5 µM)

2,5 µl 5`JH Primer-Mix (2,5 µM)

3 µl bzw. 4 µl MgCl₂ (25 mM)

30,4 bzw. 29,4 µl H₂O

+1 µl *template* (PCR-Produkt 1. Runde)

+0,6 µl DNA-Polymerase (*Expand High Fidelity*TM, Roche Diagnostics)

MgCl₂-Konzentrationen

1,5 mM VHL1 und 5

2 mM VHL2, 3, 4 und 6

5`JH Primer-Mix (Endkonzentration je Primer 2,5 µM)

5`JHL1, 4, 5, 5`JH2, 5`JH3 und 5`JH6, versetzt mit 10 mM Tris-Puffer

PCR-Programm 2. Runde HRS- und MCL-Zellen

90°C Pause, 95°C 4 min, 35 Zyklen (95°C 50 s, 63°C 30 s und 72°C 60 s), 72°C 5 min, 15°C Pause

PCR-Programm 2. Runde CD30⁺ B-Zellen

90°C Pause, 68°C Pause (Enzymzugabe), 72°C 1 min, 34 Zyklen (95°C 50 s, 63°C 30 s und 72°C 60 s), 72°C 5 min, 15°C Pause

Tabelle 1: Sequenzen der verwendeten Primer für die IgV-Genanalyse

Name des Primers	Sequenz (5'>3')	Verwendung
VH1L	CTC-ACC-ATG-GAC-TGG-ACC-TGG-AG	1. + 2. Runde, Sequenzierung
VH2L	TGC-TCC-ACR-CTC-CTG-CTR-CTG-A	1. + 2. Runde, Sequenzierung
VH3L	ACC-ATG-GAG-TTT-GGG-CTG-AGC-TG	1. + 2. Runde, Sequenzierung
VH3.2L	ACC-ATG-GAA-CTG-GGG-CTC-CGC-TG	1. + 2. Runde, Sequenzierung
VH4L	CTC-CTG-GTG-GCA-GCT-CCC-AGA	1. + 2. Runde, Sequenzierung
VH5L	ATC-ATG-GGG-TCA-ACC-GCC-ATC-CT	1. + 2. Runde, Sequenzierung
VH6L	ACA-ATG-TCT-GTC-TCC-TTC-CTC-ATC	1. + 2. Runde, Sequenzierung
3`JH1,2,4,5	ACC-TGA-GGA-GAC-GGT-GAC-CAG-GGT	1. Runde
3`JH3	ACC-TGA-AGA-GAC-GGT-GAC-CAT-TGT	1. Runde
3`JH6	ACC-TGA-GGA-GAC-GGT-GAC-CGT-GGT	1. Runde
5`JH1,4,5	GAC-GGT-GAC-CAG-GGT-KCC-CTG-GCC	2. Runde
5`JH2	GAC-AGT-GAC-CAG-GGT-GCC-ACG-GCC	2. Runde
5`JH3	GAC-GGT-GAC-CAT-TGT-CCC-TTG-GCC	2. Runde
5`JH6	GAC-GGT-GAC-CGT-GGT-CCC-TTK-GCC	2. Runde

2.1.4 Mutationsanalyse verschiedener Gene des Kombinationslymphoms

Für die Durchführung der verschiedenen PCRs wurde DNA von Laser-mikrodissektierten HRS- und MCL-Zellproben, von denen zuvor eine Gesamtgenomvervielfältigung (engl. *whole genome amplification*, *WGA*) durchgeführt wurde, verwendet. Benötigte WGA-Proben für dieses Projekt und für die folgende Mutationsanalyse von *CD58* wurden von Markus Schneider zur Verfügung gestellt. Die anschließenden PCR-Produkte wurden auf ein

Agarosegel aufgetragen, aus dem Gel aufgereinigt und direkt von beiden Seiten sequenziert (siehe Abschnitt 2.1.7, 0, 2.1.9).

Um die Sequenzierungsergebnisse der WGA-Proben zu bestätigen, wurden in einigen Fällen zusätzlich jeweils Zweizellproben der Laser-mikrodissektierten MCL-Zellen und der HRS-Zellen analysiert. Im Fall von *TP53* wurden zusätzlich Zweizellproben von CD3⁺ Lymphozyten analysiert um den somatischen Ursprung einer gefundenen Mutation zu untersuchen. Die mikrodissektierten Zellen wurden mit 1 µl Proteinase K (18 mg/ml *PCR grade*, Roche Diagnostics) versetzt und bei 55°C für 3 Stunden verdaut. Durch eine 8-minütige Inkubation bei 95°C wurde das Enzym inaktiviert und die Proben wurden als *template* für die folgenden PCRs verwendet. Für alle PCRs wurden entsprechende Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt, wie in den jeweiligen Kapiteln beschrieben.

2.1.4.1 TP53

Um nach Mutationen von *TP53* im Kombinationslymphom zu suchen, wurde eine Zweirunden *seminested* PCR, mit 10 ng WGA-Produkt von beiden Tumorkomponenten durchgeführt. Es wurden Primer für Exon 4 bis 8 und PCR-Bedingungen verwendet, wie sie bereits beschrieben wurden (Montesinos-Rongen *et al.*, 1999). In der ersten PCR-Runde wurden Exon 4 bis 8 zusammen bei 35 Zyklen amplifiziert. In einer zweiten Runde wurde eine *seminested* PCR mit 40 Zyklen durchgeführt, bei der die einzelnen Exons amplifiziert wurden. Ein µl der Erstrunden-PCR diente hierbei als *template*. In der ersten Runde wurde ein *hotstart* durchgeführt und *Expand High Fidelity™*, *DNA polymerase mix* (Roche Diagnostics) verwendet. In der zweiten Runde wurde *Taq DNA-Polymerase* (Fermentas/Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) eingesetzt. Die PCR-Bedingungen für die PCRs mit WGA-Proben als *template*, waren identisch mit denen für PCRs mit Zweizellproben, siehe Abschnitt PCR-Protokoll und Programm für die 1. und 2. Runde. Als Positivkontrolle wurde genomische DNA von Zellen monoklonaler Zelllinien oder Einzelzellen bekannter HL-Fälle verwendet. Als Negativkontrolle dienten Reaktionsansätze ohne DNA, die aber mit Wasser versehen wurden.

PCR-Protokoll für die 1. Runde

PCR-Ansatz (50 µl)

2,5 µl dNTPs (2 mM je dNTP)

3 µl 10x PCR-Puffer ohne MgCl₂ (*Expand High Fidelity™*, Roche Diagnostics)

5 µl Primer-Mix 1. Runde (2,5 µM)

4 µl MgCl₂ (25 mM)

14 µl H₂O oder 33 µl H₂O

+21 µl Zellen und Proteinase K in 1x PCR-Puffer oder 2 µl WGA-DNA

+0,5 µl DNA-Polymerase-Mix (*Expand High Fidelity™*, Roche Diagnostics)

1. Runden Primer-Mix (Endkonzentration je Primer 1 µM)

p53 4 UA, p53 4D, p53 5/6UA, p53 5/6D, p53 7/8UA und p53 7/8D, versetzt mit 10 mM Tris-Puffer

PCR-Programm für die 1. Runde

95°C 3 min, 68°C Pause (Enzymzugabe), 72°C 1 min, 34 Zyklen (95°C 50 s, 61°C 30 s und 72°C 60 s), 72°C 5 min, 15°C Pause

PCR-Protokoll für die 2. Runde

PCR-Ansatz (50 µl)

2,5 µl dNTPs (2 mM je dNTP)

5 µl 10x PCR-Puffer mit KCL (*Fermentas*)

2,5 µl p53 D Primer (2,5 µM)

2,5 µl p53 UB Primer (2,5 µM)

4 µl MgCl₂ (25 mM)

32,2 µl H₂O

+1 µl *template* (PCR-Produkt 1. Runde)

+0,3 µl DNA-Polymerase (*Taq* DNA-Polymerase, *Fermentas*)

PCR-Programm für die 2. Runde

90°C Pause, 95°C 4 min, 40 Zyklen (95°C 50 s, 61°C 30 s und 72°C 60 s), 72°C 5 min, 15°C Pause

Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Primer für die Mutationsanalyse von TP53

Name des Primers	Sequenz (5'>3')	Verwendung
p53 4 D	AGG-GTG-AAG-AGG-AAT-CCC-AAA-GTT	Exon 4, 1. + 2. Runde, Sequenzierung
p53 4 UA	ACT-GAA-GAC-CCA-GGT-CCA-GAT-GAA	Exon 4, 1. Runde
p53 4 UB	TTC-TGT-CCC-TTC-CCA-GAA-AAC-CTA	Exon 4, 2. Runde, Sequenzierung
p53 5/6 D	AGG-GCC-ACT-GAC-AAC-CAC-CCT-TA	Exon 5+6, 1. + 2. Runde, Sequenzierung
p53 5/6 UA	TGT-TCA-CTT-GTG-CCC-TGA-CTT-TCA	Exon 5+6, 1. Runde
p53 5/6 UB	CTC-TGT-CTC-CTT-CCT-CTT-CCT-ACA	Exon 5+6, 2. Runde, Sequenzierung
p53 7/8 D	ACC-GCT-TCT-TGT-CCT-GCT-TGC-TTA	Exon 7+8, 1. + 2. Runde, Sequenzierung
p53 7/8 UA	CAA-GGC-GCA-CTG-GCC-TCA-TCT-T	Exon 7+8, 1. Runde
p53 7/8 UB	CCT-CAT-CTT-GGG-CCT-GTG-TTA-TCT	Exon 7+8, 2. Runde, Sequenzierung

2.1.4.2 *TNFAIP3*

Für die Mutationsanalyse von *TNFAIP3* im Kombinationslymphom wurde eine Zweirunden *seminested* PCR mit 10 ng WGA-Produkten und Ein- oder Zweizellproben beider Tumorbestandteile durchgeführt. Dafür wurden sequenzspezifische Primer für alle kodierenden Exons von *TNFAIP3* (Exons 2-9) eingesetzt. Aufgrund der Größe von Exon 7, wurde dieses in zwei Teilen Amplifiziert. Die PCRs wurden in der ersten Runde (35 Zyklen) als Multiplex-PCR in zwei Ansätzen durchgeführt (Ansatz A und B), bevor in der zweiten Runde (40 Zyklen) die Exons einzeln durch eine *seminested* PCR bei identischen PCR-Bedingungen amplifiziert wurden. Sowohl in der ersten als auch in der zweiten Runde wurde *Expand High Fidelity™*, *DNA polymerase mix* (Roche Diagnostics) eingesetzt (Schmitz *et al.*, 2009; Philipp *et al.*, 2011).

PCR-Protokoll für die 1. und 2. Runde

PCR-Ansatz (50 µl)

5 µl dNTPs (2 mM je dNTP)

3 µl (1. Runde) oder 5 µl (2. Runde) 10x PCR-Puffer ohne MgCl₂ (*Expand High Fidelity™*, Roche Diagnostics)

2,5 µl Primer-Mix *forward* 1. Runde oder Primer *forward* 2. Runde (2,5 µM)

2,5 µl Primer-Mix *reverse* 1. Runde oder Primer *reverse* 2. Runde (2,5 µM)

6 µl MgCl₂ (1. Runde) oder 3 µl MgCl₂ (2. Runde) (25 mM)

10 µl Betain (5 M)

+21 µl Zellen und Proteinase K in PCR-Puffer oder 1,5 µl 1. Runden-DNA +22 µl H₂O

+0,5 µl DNA-Polymerase (*Expand High Fidelity™*, Roche Diagnostics)

Primer-Mix 1. Runde (Endkonzentration je Primer (2,5 µM))

AF) E2exF, E3exF, E7.1exF und E9exF, versetzt mit 10 mM Tris-Puffer

AR) E2exR, E3exR, E7.1exR und E9exR, versetzt mit 10 mM Tris-Puffer

BF) E4/5exF, E6exF, E7.2exF und E8exF, versetzt mit 10 mM Tris-Puffer

BR) E4/5exR, E4I5exR, E7.2exR und E8exR, versetzt mit 10 mM Tris-Puffer

PCR-Programm für die 1. und 2. Runde

95°C Pause, 95°C 3 min, 40 Zyklen (95°C 30 s, 61°C 30 s und 72°C 90 s), 72°C 5 min, 15°C Pause

Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten Primer für die Mutationsanalyse von *TNFAIP3*

Name des Primers	Sequenz (5'>3')	Verwendung
A20E2exF	TGC-CTA-CAG-ATC-AGG-GTA-ATG-ACA-AG	Exon 2, 1. Runde
A20E2seqF	CCT-TTT-CAG-GTG-TTG-GAG-AG	Sequenzierung
A20E2intF	GTT-TCC-TGC-AGG-CAG-CTA-TAG-AGG	Exon 2, 2. Runde
A20E2R	AGC-TTC-ATG-AAT-GGG-GAT-CCA-GCA-G	Exon 2, 1. + 2. Runde, Sequenzierung
A20E3exF	ACC-ATT-CAG-TCC-CCT-AGA-ATA-GCA-G	Exon 3, 1. Runde
A20E3seqF	TCC-TTT-CTG-TCC-TCA-GGT-G	Sequenzierung
A20E3intF	ACC-TTT-GCT-GGG-TCT-TAC-ATG-CAG	Exon 3, 2. Runde
A20E3R	TAT-GCC-CAC-CAT-GGA-GCT-CTG-TTA-G	Exon 3, 1. + 2. Runde, Sequenzierung
A20E4-5exF	TGA-ATA-ATT-GTA-GAG-TGA-TGT-CAG-AAT-GAC	Exon 4+5, 1. Runde, Sequenzierung
A20E4-5intF	TAC-AGG-GAG-TAC-AGG-ATA-CAT-TCA-AGC	Exon 4+5, 2. Runde
A20E4-5R	GGA-AAA-CCC-TGA-TGT-TTC-AGT-GTC-TAG	Exon 4+5, 1. + 2. Runde, Sequenzierung
A20E6exR	AAT-CAC-TCT-ACT-GTT-GAG-CTT-CAG-G	Exon 6, 1. Runde, Sequenzierung
A20E6F	TGA-GAT-CTA-CTT-ACC-TAT-GGC-CTT-G	Exon 6, 2. Runde
A20E6intR	TCA-GGT-GGC-TGA-GGT-TAA-AGA-CAG	Exon 6, 1. + 2. Runde, Sequenzierung
A20E7.1exF	GGT-TCT-ACA-ATT-CTT-GCC-ATA-ATC-CAC	Exon 7, 1. Runde, Sequenzierung
A20E7.1intF	GAG-CTA-ATG-ATG-TAA-AAT-CTT-GTG-TGT-G	Exon 7, 2. Runde
A20E7.1R	CAA-AAT-CCG-TTG-TGC-TGC-ACA-TTC-AG	Exon 7, 1. + 2. Runde, Sequenzierung
A20E7.2exR	CAG-TTC-TGC-CTG-ACT-GCC-TAC-ATG	Exon 7, 1. Runde, Sequenzierung
A20E7.2F	CTC-TCG-GGG-AGA-AGC-CTA-TGA-GC	Exon 7, 2. Runde
A20E7.2intR	GAA-CAA-AAC-CCC-TTC-TGG-ACA-GCA-G	Exon 7, 1. + 2. Runde, Sequenzierung
A20E8exR	ATG-AGG-AGA-CAG-AAC-CTG-GCA-GAG	Exon 8, 1. Runde, Sequenzierung
A20E8F	ACT-GTC-AGC-ATC-TCT-GTA-TCG-GTG	Exon 8, 2. Runde
A20E8intR	TGT-CAC-TGT-CGG-TAG-AAA-ACG-CTC	Exon 8, 1. + 2. Runde, Sequenzierung
A20E9exF	GTA-GAC-TCC-ACA-CTC-TCC-AAT-GAG	Exon 9, 1. Runde, Sequenzierung
A20E9intF	GTG-CTC-TCC-CTA-AGA-AAT-GTG-AGC	Exon 9, 2. Runde
A20E9R	GGG-TTA-CCA-AAC-CTG-AGC-ATC-GTG-C	Exon 9, 1. + 2. Runde, Sequenzierung

2.1.4.3 *NFKBIA*

Für die Mutationsanalyse der Exons 3-6 von *NFKBIA* wurde eine *seminested* PCR mit 10 ng WGA-Produkten, wie in (Jungnickel *et al.*, 2000) beschrieben, durchgeführt. Die PCRs wurden in der ersten Runde (35 Zyklen) als Multiplex-PCR durchgeführt, bevor in der zweiten Runde (40 Zyklen) die Exons einzeln durch eine *seminested* PCR amplifiziert wurden. Sowohl in der ersten als auch in der zweiten Runde wurde *Expand High Fidelity™*, *DNA polymerase mix* (Roche Diagnostics) und 1 M Betain eingesetzt. Auch für Exon 1 und 2

wurde eine Zweirunden *seminested* PCR unter gleichen Bedingungen durchgeführt, allerdings wurde in der ersten Runde der PCR rTth DNA-Polymerase mit entsprechendem PCR-Puffer (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) und in der zweiten Runde *Taq* DNA-Polymerase (Fermentas) verwendet.

PCR-Protokoll für die 1. Runde

PCR-Ansatz (50 µl)

5 µl dNTPs (2 mM je dNTP)

5 µl 10x PCR-Puffer ohne MgCl₂ (*Expand High Fidelity*[™], Roche Diagnostics)

2 µl Primer-Mix 1. Runde (1,25 µM)

4 µl MgCl₂ (25 mM)

10 µl Betain (5 M)

22,5 µl H₂O oder 33 µl H₂O

+1 µl WGA-DNA

+0,5 µl DNA-Polymerase (*Expand High Fidelity*[™], Roche Diagnostics) oder rTth DNA-Polymerase (Applied Biosystems)

Primer-Mix 1. Runde (Endkonzentration je Primer 1 µM)

IKB3a, IKB3d, IKB4b, KB4c, IKB5a, IKB5d, IKB6a, IKB6d versetzt mit 10 mM Tris-Puffer oder IKB1b, IKB1e, IKB2a, IKB2c versetzt mit 10 mM Tris-Puffer

PCR-Programm für die 1. Runde

95°C 4 min, 68°C Pause (Enzymzugabe), 72°C 1 min, 34 Zyklen (95°C 30 s, 63°C 30 s und 72°C 60 s), 72°C 5 min, 15°C Pause

PCR-Protokoll für die 2. Runde

PCR-Ansatz (30 µl)

3 µl dNTPs (2 mM je dNTP)

3 µl 10x PCR-Puffer mit KCl (Fermentas)

3 µl *forward* Primer (2,5 µM)

3 µl *reverse* Primer (2,5 µM)

2 µl MgCl₂ (25 mM)

6 µl Betain (5 M)

7,7 µl H₂O

+2 µl *template* (PCR-Produkt 1. Runde)

+0,3 µl DNA-Polymerase (*Taq* DNA-Polymerase, Fermentas)

PCR-Programm für die 2. Runde

90°C Pause, 95°C 3 min, 40 Zyklen (95°C 30 s, 63°C 30 s und 72°C 60 s), 72°C 5 min, 15°C Pause

Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten Primer für die Mutationsanalyse von *NFKBIA*

Name des Primers	Sequenz (5'>3')	Verwendung
IKB1b	TGG-TCT-GAC-TGG-CTT-GGA-AAT-TC	Exon 1, 1. + 2. Runde, Sequenzierung
IKB1e	AGC-GTT-CGG-GGC-GGT-GCA-GGA-G	Exon 1, 1. Runde
IKB1h	CAG-CGC-CCC-AGC-GAG-GAA-GCA-G	Exon 1, 2. Runde, Sequenzierung
IKB2a	CGA-AGT-CCC-CGG-TTG-CAT-AAG-G	Exon 2, 1. Runde
IKB2c	GGA-TCT-GGG-GTG-ACT-CTG-CTA-C	Exon 2, 1. + 2. Runde, Sequenzierung
IKB2b2	GCC-TGC-CAG-GAA-CAC-TCA-GCT-C	Exon 2, 2. Runde, Sequenzierung
IKB3a	CCT-GTC-TAG-GAG-GAG-CAG-CAC	Exon 3, 1. Runde
IKB3b	AAC-CAG-GAG-ACA-CGG-GTT-GAG-G	Exon 3, 2. Runde, Sequenzierung
IKB3d	TAG-GAG-TTT-AAG-CTC-TTG-CCT-GGA	Exon 3, 1. + 2. Runde, Sequenzierung
IKB4b	AAA-GAA-TAG-GTG-AAA-GGA-GTG-AGG	Exon 4, 1. Runde
IKB4b2	GAG-GGT-TGA-AAC-AGG-TGG-TTA-T	Exon 4, 2. Runde, Sequenzierung
IKB4c	ATA-AGC-ACG-AGG-AGC-CTG-ACT-CA	Exon 4, 1. + 2. Runde, Sequenzierung
IKB5a	AGC-AGA-AAT-TCC-AAA-TGC-AGC-CAT	Exon 5, 1. + 2. Runde, Sequenzierung
IKB5c	GGA-GGG-TGA-AGG-GAA-TGG-CAC	Exon 5, 2. Runde, Sequenzierung
IKB5d	GGA-GCA-GCT-CTA-GGG-GCC-TG	Exon 5, 1. Runde
IKB6a	GAG-TTA-TTT-CCA-GTA-GTG-GCC-TC	Exon 6, 1. Runde
IKB6b	CCC-ATC-CCG-GTA-GCT-TGG-CAG	Exon 6, 2. Runde, Sequenzierung
IKB6d	GGG-GTC-AGT-CAC-TCG-AAG-CAC	Exon 6, 1. + 2. Runde, Sequenzierung

2.1.4.4 SOCS1

Hundert ng WGA-Produkt wurde als *template* für die Amplifizierung des kodierenden Bereiches von *SOCS1* verwendet. Die PCR wurde mit rTtH DNA-Polymerase (Applied Biosystems) unter folgenden PCR-Bedingungen durchgeführt: 95°C Pause, 95°C 3,5 min, 40 Zyklen (95°C 30 s, 60°C 30 s und 68°C 180 s), 72°C 15 min, 15°C Pause. Die DNA der Zweizellproben wurde für eine Zweirunden *seminested* PCR verwendet. Dabei dienten 2 µl PCR-Produkt der ersten Runde als *template* für die zweite Runde. In der ersten Runde wurde *Taq* DNA-Polymerase (Fermentas) und in der zweiten Runde rTtH DNA-Polymerase (Applied Biosystems) eingesetzt. Die PCR-Bedingungen waren mit Ausnahme der Elongationstemperatur für beide PCR-Runden identisch: 95°C Pause, 95°C 3,5 min, 40 Zyklen (95°C 45 s, 60°C 45 s und 72°C (68°C 2. Runde) 120 s), 72°C 15 min, 15°C Pause.

Tabelle 5: Sequenzen der verwendeten Primer für die Mutationsanalyse von *SOCS1*

Name des Primers	Sequenz (5'>3')	Verwendung
SOCS-1F	ACT-TGG-TGC-TCC-GTG-CTC-GC	Exon 1, 1. + 2. Runde, Sequenzierung
SOCs-1Ra	ACC-AGG-GGG-ACC-CAG-AGG-GA	Exon 1, 1. Runde
SOCS-1Rb	CAC-AGC-AGA-AAA-ATA-AAG-CCA-GAG	Exon 1, 2. Runde, Sequenzierung

2.1.4.5 *NOTCH1*

Für die Analyse von Teilen der häufig mutierten Bereiche (Exons 26-34) in *NOTCH1* (Kridel *et al.*, 2012), wurde 50 ng WGA-Produkt des cHL und MCL für eine Einrunden-PCR verwendet. Die PCR-Bedingungen und Primer wurden aus (Stanelle *et al.*, 2010), übernommen. Aufgrund von Unstimmigkeiten in den Ergebnissen für Exon 28 wurde zusätzlich eine Zweirunden-PCR (35 und 40 Zyklen) mit 10- und 50-Zellproben für dieses Exon durchgeführt. Es wurde in beiden Runden *Expand High Fidelity™*, *DNA polymerase mix* (Roche Diagnostics) bei identischen PCR-Bedingungen eingesetzt.

PCR-Protokoll

PCR-Ansatz (50 µl)

5 µl dNTPs (2 mM je dNTP)

5 µl 10x PCR-Puffer ohne MgCl₂ (*Expand High Fidelity™*, Roche Diagnostics)

1 µl *forward* Primer (10 µM)

1 µl *reverse* Primer (10 µM)

4 µl MgCl₂ (25 mM)

22,7/18,7 µl oder 2,7 µl H₂O

10 µl Betain 5 (M)

+1/5 µl *template* (PCR-Produkt 1. Runde /WGA Probe) oder 21 µl Zellen und Proteinase K in PCR-Puffer

+0,3 µl DNA-Polymerase (*Expand High Fidelity™*, Roche Diagnostics)

PCR-Programm

90°C Pause, 95°C 4 min, 40 Zyklen (95°C 30 s, 61/63°C 30 s und 72°C 90 s), 72°C 5 min, 15°C Pause

Tabelle 6: Sequenzen der verwendeten Primer für die Mutationsanalyse von *NOTCH1*

Name des Primers	Sequenz (5'>3')	Verwendung
exon26-fwd	CTG-AGG-GAG-GAC-CTG-AAC-TT	Exon 26, 1. Runde, Sequenzierung
exon26-rev	GGG-AGA-GTA-CTG-CTT-GCC-AT	Exon 26, 1. Runde, Sequenzierung
exon28-fwd	TGG-AGG-AGA-GTG-GGT-GAG-GA	Exon 28, 1. + 2. Runde, Sequenzierung
exon28-rev	AGA-AGT-GAG-GCT-GAG-CGA-GC	Exon 28, 1. + 2. Runde, Sequenzierung
exon34.1-fwd	GCT-GCT-TCC-TCT-GGT-GAT-G	Exon 34, 1. Runde, Sequenzierung
exon34.1-rev	GAG-GTG-GGC-CAG-TCT-CAA-AG	Exon 34, 1. Runde, Sequenzierung
exon34.2-fwd	ATG-GCT-ACC-TGT-CAG-ACG-TG	Exon 34, 1. Runde, Sequenzierung
exon34.2-rev	GCT-TTG-CTG-CTG-CTG-GAT-GT	Exon 34, 1. Runde, Sequenzierung
exon34.3-fwd	GTC-CCA-GAT-GAT-GAG-CTA-CC	Exon 34, 1. Runde, Sequenzierung
exon34.3-rev	ATC-CAC-AGA-GCG-CAC-ACA-GA	Exon 34, 1. Runde, Sequenzierung

2.1.5 Mutationsanalyse von *CD58* von mikrodissektierten HRS-Zellen und cHL-Zelllinien

Für die Mutationsanalyse von *CD58* wurden HRS-Zellen primärer cHL-Fälle verwendet. Die HRS-Zellen wurden mittels Laser-Mikrodissektion als Ein- und Zweizellproben isoliert oder als Gruppe von 200 Zellen für die Durchführung einer WGA verwendet.

Es wurde eine *seminested* PCR über zwei Runden mit 10 ng WGA-Produkt von 10 primären cHL Fällen durchgeführt. In der ersten Runde wurden alle kodierenden Exons (1-6) zusammen als Multiplex-PCR mit 35 Zyklen amplifiziert. In einer zweiten Runde wurde eine *seminested* PCR mit 40 Zyklen durchgeführt, bei der die einzelnen Exons amplifiziert wurden. *Expand High Fidelity™*, *DNA polymerase mix* (Roche Diagnostics) wurde in der ersten Runde und *Taq* DNA-Polymerase (Fermentas) in der zweiten PCR Runde eingesetzt. Die PCR-Bedingungen waren identisch für die 1. und 2. Runde, siehe Abschnitt PCR-Protokoll und Programm. Um die Ergebnisse der PCRs, die mit WGA-Proben durchgeführt wurden, zu bestätigen, wurden zusätzlich Ein- oder Zweizellproben von 7 der 10 primären HL-Fälle analysiert. Die HRS-Zellen wurden mit 1 µl Proteinase K (18 mg/ml *PCR grade*, Roche Diagnostics) versetzt und bei 55°C für 3 Stunden verdaut. Durch eine 8-minütige Inkubation bei 95°C wurde das Enzym inaktiviert und die Proben wurden als *template* für eine Zweirunden *seminested* PCR, verwendet. Die PCR-Bedingungen waren mit Ausnahme von Exon 1 identisch zu denen, wie sie schon für die WGA-Proben beschrieben wurden. Exon 1 wurde in beiden Runden separat amplifiziert mit einer *Annealing*-Temperatur von 63°C. Für die Mutationsanalyse der cHL-Zelllinien wurde eine *seminested* PCR über zwei Runden mit 5 ng DNA in der ersten Runde durchgeführt. Die PCR-Bedingungen waren dieselben wie für die Analyse der mikrodissektierten Ein- und Zweizellproben.

Als Positivkontrolle wurden CD19⁺ B-Zellen, als Keimbahnkontrolle gepickte Nicht-Tumorzellen und als Negativkontrolle Wasserkontrollen mitgeführt. Die anschließenden PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, aus dem Gel aufgereinigt und direkt von beiden Seiten sequenziert (siehe Abschnitt 2.1.7, 0 und 2.1.9).

PCR-Protokoll für die 1. und 2. Runde

PCR-Ansatz (50 µl)

5 µl dNTPs (2 mM je dNTP)

5 µl 10x PCR-Puffer mit MgCl₂ (*Expand High Fidelity*[™], Roche Diagnostics, 1. Runde) oder

5 µl 10x PCR-Puffer mit KCl (Fermentas, 2. Runde)

5 µl 1. Runden Primer-Mix (1 µM) oder 2. Runde *forward* Primer (2,5 µM) und 2,5 µl 2. Runden *reverse* Primer (2,5 µM)

3 µl MgCl₂ (25 mM)

+21 µl Zellen und Proteinase K in 1x PCR-Puffer oder 1 µl PCR-Produkt der 1. Runde + 22 µl H₂O

+0,5 µl DNA-Polymerase (*Expand High Fidelity*[™], Roche Diagnostics, 1. Runde) oder 0,3 µl *Taq* DNA-Polymerase (Fermentas, 2. Runde)

Primer-Mix 1. Runde (Endkonzentration je Primer 1 µM)

CD58ex1f +r1, CD58ex2f +r1, CD58ex3f +r1, CD58ex4f +r1, CD58ex5f +r1, CD58ex6f +r1, versetzt mit 10 mM Tris-Puffer

PCR-Programm für die 1. und 2. Runde

85°C Pause, 95°C 3 min, 35/45 Zyklen (95°C 50 s, 61/63°C 30 s und 72°C 60 s), 72°C 5 min, 15°C Pause; In der ersten Runde wurde zu Beginn statt der 95° 3 min, ein *hotstart* (95°C 5 min, 68°C Pause, 72°C 60 s) durchgeführt.

Tabelle 7: Sequenzen der verwendeten Primer für die Mutationsanalyse von CD58

Name des Primers	Sequenz (5'>3')	Verwendung
CD58ex1f	GGA-ATG-GCG-GCG-GAA-TGA-CG	Exon 1, 1.+2. Runde, Sequenzierung
CD58ex1r1	ACG-GCT-GAG-TTG-TTC-CCG-GCC	Exon 1, 1. Runde,
CD58ex1r2	CTG-ATC-GGC-AAC-CGC-CTC-GAG	Exon 1, 2. Runde, Sequenzierung
CD58ex2f	CCC-AGC-CCA-GCC-CGT-ACT-ACC	Exon 2, 1.+2. Runde, Sequenzierung
CD58ex2r1	GGT-TAG-ATT-CTC-TCC-TCA-CCC-AGA-GG	Exon 2, 1. Runde,
CD58ex2r2	AAA-AGG-AGA-AAA-CCC-TGA-CAA-CAG-G	Exon 2, 2. Runde, Sequenzierung
CD58ex3f	TTG-CGA-GCT-CTT-CAT-AAA-TTT-GCA-GAT	Exon 3, 1.+2. Runde, Sequenzierung
CD58ex3r1	CAA-AAT-TGT-GAA-CCT-TGT-GTT-AGT-CAC-C	Exon 3, 1. Runde,
CD58ex3r2	CAC-ATC-TGT-GGT-CTG-AAA-GCC-TCC	Exon 3, 2. Runde, Sequenzierung

CD58ex4f	GTA-AAT-AAG-CAA-ACC-GCA-AGG-TGG-A	Exon 4, 1.+2. Runde, Sequenzierung
CD58ex4r1	GTA-AAG-CTC-TCT-GTG-GCC-TAA-GGA-TTC	Exon 4, 1. Runde,
CD58ex4r2	CAT-GCT-CAG-CAG-TCC-CAC-ACA-CG	Exon 4, 2. Runde, Sequenzierung
CD58ex5f	TCT-GGC-TTA-GTT-TTC-CAT-ATT-TAG-GCC	Exon 5, 1.+2. Runde, Sequenzierung
CD58ex5r1	GTC-TCT-AAG-CAA-GGG-GTA-TGA-TAC-TCC-T	Exon 5, 1. Runde,
CD58ex5r2	ACG-ATA-TGC-AGA-GAG-TGG-CTA-GTG-CAG	Exon 5, 2. Runde, Sequenzierung
CD58ex6f	TCC-CTC-CAT-CCC-TGC-TCC-CTA-GC	Exon 6, 1.+2. Runde, Sequenzierung
CD58ex6r1	CTT-TTC-TCC-CTC-ACT-CCA-TGA-ATG-AC	Exon 6, 1. Runde,
CD58ex6r2	TCC-CCT-AAA-GCA-AGG-GAG-AAA-GAG-TAT-AG	Exon 6, 2. Runde, Sequenzierung

2.1.6 Quantitative real-time PCR

Die Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht. Über Fluoreszenzfarbstoffe kann die Zunahme von PCR-Produkten in Echtzeit verfolgt werden und die Quantifizierung der gewonnenen DNA wird ermöglicht. So lassen sich Aussagen über die relativen RNA-Expressionslevel eines spezifischen Gens in einer Probe treffen. Die real-time PCR wurde mit Hilfe von kommerziell erhältlichen genspezifischen *TaqMan®-Sonden* und dem ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. Hierfür wurde der *TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG* (Applied Biosystems) und bereits validierte *TaqMan®-Sonden* für MYC (Hs00153408_m1), PRDM1 (Hs00153357_m1), BACH2 (Hs00222364_m1), FOXP1 (Hs00908900_m1), CCL22 (Hs01574247_m1) und EBI2 (Hs00270639_s1), welche mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein (FAM) markiert waren, nach Herstellerangaben verwendet. Die Ansätze hatten ein Gesamtvolumen von 10 µl und enthielten 1 µl cDNA von 500 Zellen pro Probe. In den Analysen wurden alle Proben dreifach angesetzt und zusätzliche Wasserkontrollen mitgeführt. Insgesamt wurden CD30⁺ B-Zellen von sechs Tonsillen untersucht. Das verwendete Standardprogramm zur Messung lautet 10 min 95°C, 45 Zyklen (15 s 95°C und 60 s 60°C). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der erhaltenen *Cycle threshold* (Ct, Schwellenwert-Zyklus)-Werte und der SDS 2.2 v6.1 Software (Applied Biosystems). Der Ct-Wert beschreibt den Zyklus der PCR an dem die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Dies lässt dann einen Rückschluss auf die entsprechende DNA-Menge zu. Zur Ermittlung von Signifikanzen der Genexpression zwischen zwei B-Zellpopulationen wurde der ungepaarte zweiseitige T-Test verwendet.

2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese. Je nach Größe der DNA-Fragmente werden Agarosekonzentrationen von 0,8-2% verwendet, die sich in ihrer Porengröße unterscheiden.

Die negativ-geladenen DNA-Moleküle wandern hierbei im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Die Trennung im Agarosegel erfolgt nach Größe, dabei wandern größere Moleküle langsamer durch die Gelmatrix als kleinere Moleküle. Mit Hilfe von Längenstandards kann die Größe der Moleküle bestimmt werden und die Menge an DNA abgeschätzt werden. Die DNA-Moleküle werden im Gel durch Interkalation von *GelRedTM* (10 µl pro 100 ml Gel, Biotium, Hayward USA) unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Proben wurden mit 1x Gelladepuffer (6x *orange DNA Loading Dye*, Fermentas) vermischt, in die Taschen von 2%igen TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Agarosegelen pipettiert und bei einer Spannung von 10 V/cm Abstand der Elektroden laufen gelassen. Der mitaufgetragene Mengen- oder Größenstandard (*Low DNA Mass Ladder*, Invitrogen oder 100-1000 bp DNA-Leiter, *GeneRulerTM DNA Ladder*, Fermentas) ermöglichte die Bestimmung von Konzentration und Größe der DNA-Fragmente.

50 x TAE Puffer: 2 M Tris-Acetat
 50 mM EDTA, pH 8,0
 Auf 1 L mit ddH₂O auffüllen

2.1.8 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die entstandenen DNA-Fragmente wurden mit dem *InnuPREP DoublePure Kit* (Analytik Jena, Jena, Deutschland) oder mit dem *QIAEX II Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben aus Agarosegelen aufgereinigt.

2.1.9 Sequenzreaktion und Auswertung

Die PCR-Produkte wurden nach einem modifizierten Protokoll der Sequenzierungsmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) mit dem *Big Dye Desoxy Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) sequenziert. Jeder Reaktionsansatz enthielt die entsprechende Menge an DNA, 1 µl *Big-Dye-Lösung*, 3,75 µl 5x *Sequencing Puffer* und 0,75 µl des entsprechenden Primer. Das Volumen wurde auf 20 µl mit H₂O aufgefüllt und die Sequenzreaktion gestartet (95°C 5 min, 24 Zyklen (95°C 15 s, 50°C 10 s und 60°C 4 s), 15°C Pause).

Es folgte eine Ethanol-Fällung, bei der der 20 µl Sequenzieransatz mit 40 µl Wasser, 150 µl Ethanol (100%) und 6 µl 3 M Natriumacetat/Dextranblau versetzt wurde. Der Ansatz wurde gemischt und 30 min bei RT und 15000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das leicht blaue Pellet mit 200 µl Ethanol (70%) gewaschen (10 min bei 15000 x g zentrifugieren) und an der Luft getrocknet. Die Proben wurden bis zur Messung bei ca. 4°C gelagert. Die DNA-Fragmente wurden auf dem ABI-3130-Sequenzierautomaten (Applied Biosystems) analysiert. Die erhaltenen Sequenz-Elektropherogramme wurden im

Anschluss mit dem Programm *Chromas Lite* (Technelysium Pty Ltd, Australien) begutachtet und je nach Fragestellung mit Hilfe des DNASIS-Programm (Pharmacia, Schweden), der Sequenzanalyse-Software SeqScape (Applied Biosystems) oder der IMGT/V-Quest Datenbank (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=humanlg) untersucht und ausgewertet.

2.1.10 Produktion von überhängenden Adenin-Enden

PCR-Produkte wurden wie folgt für die Ligation mit einem Adenin-Überhang versehen:

X	DNA (ng)
2 µl	10x Fermentas-Puffer
1,2 µl	25 mM MgCl ₂ (Fermentas)
2 µl	dATPs (10 mM)
0,3 µl	Taq DNA-Polymerase (Fermentas)
add 20 µl	H ₂ O

Der 20 µl Ansatz wurde für 20 min bei 72 °C inkubiert. Bevor das modifizierte PCR-Produkt für die Ligation weiterverwendet wurde, wurde eine Extraktion nach dem Prinzip der Ethanol-Fällung (siehe 2.1.9) durchgeführt.

2.1.11 Ligation von DNA zur Klonierung

Die Klonierung wurde mit dem *pGEM-T Easy* Vektorsystem (Promega, Mannheim) durchgeführt. Der *pGEM-T Easy* Vektor ist ein geöffnetes Plasmid mit 3'überhängenden Thymidin-Enden, die als „*Sticky end*“ wirken und eine Restriktion des Plasmids und der einzufügenden DNA erübrigt. PCR-Produkte mit überhängenden Adenin-Enden, können direkt in diesen Vektor ligiert werden. PCR-Produkte denen überhängende Adenin-Enden fehlen, müssen diese zuvor angefügt werden (siehe 2.1.10). Für die Ligation wurden 0,5 - 2,5 µl PCR-Produkt mit 1 µl *pGEM-T Easy* Plasmidvektor, 1 µl T4 DNA-Ligase (3 U/µl) und 5 µl Ligationspuffer gemischt. Das Mengenverhältnis von Vektor und PCR-Produkt wurde mit folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{\text{Vektor (ng)} \times \text{Länge PCR-Produkt (kb)}}{\text{Länge Vektor (kb)}} \times \text{Molares Verhältnis PCR-Produkt : Vektor} = \text{PCR-Produkt (ng)}$$

Anschließend wurde mit bi-distilliertem H₂O auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt und die Ansätze über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.1.12 Hitzeschock-Transformation

Unter Transformation versteht man das Einbringen exogener DNA in Bakterienzellen. Die chemisch kompetenten Bakterien (*XL1-Blue® competent E. coli cells*, Agilent, Wallbronn) wurden zunächst auf Eis für 10 Min aufgetaut und anschließend mit β-Mercaptoethanol für

10 min inkubiert. Ein Aliquot von 20 µl kompetenter Zellen zusammen mit 3 µl Ligationsansatz wurde zur Aufnahme des Plasmids für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz einem 40-sekündigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, erneut 2 min auf Eis inkubiert und dann mit 200 µl SOC-Medium versetzt.

<u>SOC-Medium:</u>	2 %l	(w/v) Pepton
	0,5%	(w/v) Hefeextrakt)
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MgSO ₄
	20 mM	Glukose

Die Bakterienkulturen wurden für 50 min bei 37°C geschüttelt (225 rpm) und anschließend auf Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platten ausgespatelt und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Die Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platten wurden zuvor mit 100 µl Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, 100 mM, Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 50 µl Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (X-Gal, 50 mg/ml, Roth) vorbehandelt. Die anschließende Selektion von positiven Klonen erfolgt durch das sogenannte „Blau-Weiß-Screening“. Dabei enthält der Vektor an der Klonierungsstelle das lacZ-Gen, das für eine β-Galactosidase kodiert, die X-Gal spalten kann. X-Gal wird mit Hilfe von Sauerstoff in einen blauen Farbstoff umgewandelt werden, der die Kolonien blau erscheinen lässt. Dies ist jedoch nur der Fall bei Bakterien denen das einzufügende PCR-Produkt im Vektor fehlt. Hat das Plasmid ein PCR-Produkt aufgenommen, kann keine funktionierende β-Galactosidase exprimiert werden, dadurch X-Gal nicht gespalten und die Kolonien bleiben weiß. Das IPTG ist dabei notwendig um den lac-Promotor zu stimulieren.

2.1.13 Plasmidaufreinigung

Transformierte Klone wurden einzeln von den LB-Agar-Platten gepickt und in je 3 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium im Schüttler bei 37 °C und 225 rpm über Nacht inkubiert. Die Plasmide wurden mit Puffern des *NucleoBond® PC 500 Kit* (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach folgendem Protokoll isoliert: Je 2 ml der Bakterienkulturen wurden zentrifugiert (1 min, 15000 x g), der Überstand verworfen und die Zellen in 300 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µl Lysepuffer, der die Zellen durch alkalische Lyse aufschließt. Die Proben wurden vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Die zellulären Proteine wurden durch Zugabe von 300 µl Neutralisationspuffer und 10-minütiger Inkubation auf Eis ausgefällt. Die Proben wurden zentrifugiert (15 min, 15000 x g), der Überstand abgenommen, mit 600 µl Isopropanol versetzt und 30 min zentrifugiert (15000 x g, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen (10 min, 15000 x g, 4°C), getrocknet und anschließend in 30 µl H₂O aufgenommen.

2.2 Proteinarbeitstechniken

2.2.1 Isolierung humaner B-Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die Isolierung verschiedener B-Zellpopulationen erfolgte aus Biopsien von Routine-Tonsillektomien. Bei den Spendern handelte es sich hauptsächlich um Kinder und junge Erwachsene. Die Weitergabe der Gewebeproben wurde durch die lokale Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen genehmigt und setzte die Aufklärung und Einwilligung der Patienten oder ihrer Erziehungsberechtigten voraus.

Zur Gewinnung von mononukleären Zellen wurde tonsilläres Gewebe in kalter Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS, GIBCO®, Life Technologies) mit 0,5% Rinder-Serum-Albumin (BSA, Sigma-Aldrich) mit einem Skalpell zerkleinert. Gewebereste wurden durch wiederholtes Filtern mit engmaschigen Sieben entfernt und die Zellsuspension durch ein 100 µm Sieb gepresst. Nach einem Waschschriff mit 30-40 ml PBS/BSA 0,5 % wurde eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dazu wurden 15 ml *Lymphocyte Separation Medium* (Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland oder PAA, Pasching, Österreich) vorsichtig mit 35 ml der tonsillären Zellsuspension überschichtet und 35 min bei 400 x g ohne Bremse zentrifugiert. Die gewonnenen mononukleären Zellen wurden 1:2 mit PBS/BSA 0,5% aufgefüllt, gesiebt (50 µm Sieb) und gewaschen (5 min bei 400 x g zentrifugiert). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml PBS/BSA 0,5% resuspendiert und für die magnetisch aktivierte Zellsortierung (engl. *magnetic activated cell sorting*, MACS) weiterverwendet.

2.2.2 Anreicherung von humanen CD30⁺ B-Zellen mittels MACS

Zur Gewinnung von CD30⁺ B-Zellen wurde zunächst eine Depletion von CD3⁺ T-Zellen mit Hilfe eines CD3-MACS durchgeführt. Dazu wurden die MACS-LD Säulen (Milenyi Biotech) und CD3-MicroBeads verwendet. Pro MACS-LD Säule wurden maximal 2×10^8 Zellen mit 100-200 µl CD3-MicroBeads in einem Puffervolumen von 500-1000 µl für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Waschschriff mit 10-fachem Volumen PBS/BSA 0,5%. Die mit den MicroBeads markierten Zellen wurden nach Protokoll des Herstellers auf die MACS-LD Säulen gegeben. Die CD3⁺ Zellen wurden an die Säule gebunden und der Durchlauf, der hauptsächlich aus B-Zellen bestand, aufgefangen. Da die CD30⁺ B-Zellen auch im Durchlauf immer noch eine sehr kleine Population darstellt, wurden diese Zellen anschließend durch einen CD30-MACS angereichert. Dafür wurden pro MACS-LS Säule maximal 2×10^8 Zellen mit 100-200 µl CD30-MicroBeads in einem Puffervolumen von 500-1000 µl für 20 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein Waschschriff mit 10-fachem Volumen PBS/BSA 0,5% und die markierten Zellen wurden nach Protokoll des Herstellers auf die MACS-LS Säulen gegeben. Die CD30⁺ B-Zellen wurden zunächst an die Säule gebunden und im Anschluss eluiert. Das

Eluat und der Durchfluss mit den übrigen B-Zellen wurden gesammelt und bis zur Antikörperfärbung auf Eis gestellt.

Vor und nach jedem MACS wurde von einem kleinen Aliquot die Zellzahl der Suspensionen bestimmt (siehe 2.4.3) und die Reinheit bzw. der Erfolg der CD3-Depletion, sowie der CD30-Anreicherung bestimmt. Hierzu wurde eine Zweifach-Fluoreszenzfärbung mit ungefähr $0,5 \cdot 10^5$ Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Reaktionsvolumen von 100 µl mit dem anti-CD3-PE- und anti-CD20-FITC-Antikörpern für 15 min auf Eis gefärbt. Nachdem die Zellen mit 2 ml PBS/BSA 0,5% gewaschen wurden (5 min bei 400 x g zentrifugiert), wurden sie mit einem Fluoreszenz-aktivierten Zellanalysegerät (FACS)-Canto (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany), analysiert.

Tabelle 8: Verwendete Antikörper und MicroBeads

Spezifität der Antikörper/Beads	Klon	Spezies	Isotyp	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
anti-CD3	unbekannt	Maus	IgG2a	Beads	1:3 - 1:6	Miltenyi Biotech
anti-CD30	Ki-2	Maus	IgG1	Beads	1:3 - 1:6	Miltenyi Biotech
anti-CD3	UCHT1	Maus	IgG1κ	PE	1:8	BD Biosciences
anti-CD20	2H7	Maus	IgG2b κ	FITC	1:7	BD Biosciences

2.2.3 Phänotypische Analyse von CD30⁺ B-Zellen

Bei der Durchflusszytometrie können die unterschiedlichen optischen Eigenschaften einzelner Zellen mit Hilfe von Laserstrahlen untersucht werden und mittels spezifischer Fluoreszenzantikörper bestimmte Zellen bzw. Zellbestandteile markiert und analysiert werden.

Für die phänotypische Analyse wurden die aus den Tonsillen angereicherten CD30⁺ B-Zellen mit anti-CD20-PerCP-Cy5.5-, anti-CD38-APC- und anti-CD-30-PE-Antikörpern gefärbt und in CD30⁺ GC-B-Zellen (CD20⁺⁺CD30⁺CD38⁺), CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen (CD20⁺CD30⁺CD38^{low}) und CD30⁻ GC-B-Zellen (CD20⁺⁺CD30⁻CD38⁺) unterteilt. Die phänotypische Analyse erfolgte mit einem der folgenden zusätzlichen Antikörper: anti-CD27-FITC-, anti-IgM-FITC-, anti-IgG-FITC-, anti-IgA-FITC-, anti-IgE-FITC-, und anti-Maus-IgG1κ-FITC-Antikörper als Isotypkontrolle. In weiteren Färbungen wurden Antikörper gegen CD30, CD38, IgM und IgD kombiniert. Zusätzlich wurde noch eine CD30-Negativkontrolle, d.h. eine CD20- und CD38-Färbung ohne CD30-Antikörper mitgeführt. Die Analyse erfolgte an einem BD FACS-Canto und wurde mit der zugehörigen Software sowie mit der *FlowJo data analysis software* (FLOWJO, LLC, Ashland, USA) ausgewertet.

Tabelle 9: Verwendete Antikörper für die phänotypische Analyse

Spezifität der Antikörper	Klon	Spezies	Isotyp	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
anti-CD20	2H7	Maus	IgG2b κ	PerCP-Cy5.5	1:12	BD Biosciences
anti-CD20	2H7	Maus	IgG2b κ	FITC	1:7	BD Biosciences
anti-CD38	HIT2	Maus	IgG1κ	APC	1:7	BD Biosciences
anti-CD30	BerH8	Maus	IgG1κ	PE	1:4	BD Biosciences
anti-CD27	M-T271	Maus	IgG1κ	FITC	1:5	BD Biosciences
anti-IgM	G20-127	Maus	IgG1κ	FITC	1:5	BD Biosciences
anti-IgD	IA6-2	Maus	IgG2a κ	PE-Cy7	1:8	BD Biosciences
anti-IgG	G18-145	Maus	IgG1κ	FITC	1:7	BD Biosciences
anti-IgA	IS11-8E10	Maus	IgG1κ	FITC	1:7	Miltenyi Biotech
anti-IgE	MB10-5C4	Maus	gG1κ	FITC	1:10	Miltenyi Biotech
anti-Maus IgG1κ	MOPC-21	Maus	IgG1κ	FITC	1:7	BD Biosciences
anti-MausIgG2a, κ	G155-178	Maus	IgG2a, κ	PE-Cy7	1:8	BD Biosciences

2.2.4 Sortierung von CD30⁺ GC- und CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen für die IgV-Genanalyse

Die aus den Tonsillen angereicherten CD30⁺ B-Zellen wurden mit anti-CD20-FITC-, anti-CD38-APC- und anti-CD-30-PE-Antikörpern nach Herstellerangaben gefärbt, gewaschen (5 min bei 400 x g zentrifugiert) und mit einem FACS-Diva Zellsortierer (Becton Dickinson) sortiert. Die CD30⁺ GC-B-Zellen wurden dabei definiert als CD20⁺⁺CD30⁺CD38⁺ und die CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen als CD20⁺CD30⁺CD38^{low}. Die Reinheit der sortierten Populationen wurde am FACS-Canto überprüft.

Tabelle 10: Verwendete Antikörper

Spezifität der Antikörper	Klon	Spezies	Isotyp	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
anti-CD20	2H7	Maus	IgG2b κ	FITC	1:4	BD Biosciences
anti-CD38	HIT2	Maus	IgG1κ	APC	1:7	BD Biosciences
anti-CD30	Ki-2	Maus	IgG1κ	PE	1:4	Miltenyi Biotech

2.2.5 Sortierung verschiedener B-Zellpopulationen für qRT-PCR und Western Blot

Für die spätere qRT-PCR wurden die aus den Tonsillen angereicherten CD30⁺ B-Zellen mit anti-CD20-PerCP-Cy5.5-, anti-CD38-PE- und anti-CD30-APC-Antikörper nach Herstellerangaben gefärbt, gewaschen (5 min bei 400 x g zentrifugiert) und mit einem FACS-Diva Zellsortierer (Becton Dickinson) sortiert. Die CD30⁺ GC-B-Zellen wurden dabei definiert als CD20⁺⁺CD30⁺CD38⁺ und die CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen als CD20⁺CD30⁺CD38^{low}. Die im Durchlauf gesammelten CD30⁻ B-Zellen wurden mit anti-CD20-PerCP-Cy5.5-, anti-CD38-PE-, anti-CD-30-APC- und anti-CD27-FITC-Antikörper angefärbt und im Anschluss gewaschen und sortiert. Es wurden Aliquots von CD30⁻ Gedächtnis-B-Zellen (CD20⁺CD38⁻CD27⁺CD30⁻), CD30⁻ GC-B-Zellen (CD20⁺⁺CD38⁺CD27⁺CD30⁻) sowie Plasmazellen (CD20⁺CD38⁺CD27⁺CD30⁻) sortiert und ihre Reinheit überprüft. Für den Western Blot wurde bei der Sortierung nicht zwischen CD30⁺ GC- und CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen unterschieden, sondern beide Populationen zusammen sortiert (CD30⁺CD20⁺). Des Weiteren wurden CD30⁻ Gedächtnis-B-Zellen (CD20⁺CD38⁻CD27⁺CD30⁻) und CD30⁻ GC-B-Zellen (CD20⁺CD38⁺CD27⁺CD30⁻) sortiert. Die Sortierung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Marc Weniger aus unserem Labor.

Tabelle 11: Verwendete Antikörper

Spezifität der Antikörper	Klon	Spezies	Isotyp	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
anti-CD20	2H7	Maus	IgG2b κ	PerCP-Cy5.5	1:12	BD Biosciences
anti-CD38	HIT2	Maus	IgG1κ	PE	1:7	BD Biosciences
anti-CD30	BerH8	Maus	IgG1κ	APC	1:5	BD Biosciences
anti-CD27	M-T271	Maus	IgG1κ	FITC	1:5	BD Biosciences

2.2.6 Western Blot

Mit dem Western Blot ist es möglich spezifische Proteine mit Hilfe eines Antikörpers nachzuweisen. Dazu wurden Proteine aus sortierten Zellen zunächst isoliert und in einem Polyacrylamidgel der Größe und Ladung nach aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und die zu untersuchenden Proteine mit spezifischen Antikörpern markiert und sichtbar gemacht.

2.2.6.1 Proteinisolierung

Pellets von ca. 250.000 sortierten Zellen wurden in 20 µl RIPA-Puffer (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) resuspendiert. Der RIPA-Puffer wurde zuvor mit Nonoxinol 40 (1%, Sigma-Aldrich), einem Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (10x, Roche Diagnostics) und

Proteinkinase-Inhibitor-Cocktail (50x, Roche Diagnostics) versetzt, um Proteolyse und Dephosphorylierung der Proteine zu verhindern. Das Gemisch wurde für 10 s gevortext dann für 10 min auf Eis inkubiert, wieder gevortext und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer wurden im Anschluss für 10 min bei 14000 x g abzentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und für die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) weiterverwendet.

2.2.6.2 SDS-PAGE

Die SDS-Page nach Laemmli ist eine biochemische Methode zum Auftrennen von Proteinen in einem Acrylamidgel im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht. Durch Inkubation der Proteine mit dem Detergenz SDS und durch starkes Erhitzen werden diese vollständig denaturiert und dissoziiert. Zusätzlich fügt die Bindung von SDS den Proteinen eine negative Ladung zu, welche proportional zur Größe des Proteins ist. Durch diese wandern die Proteine beim Anlegen einer Spannung durch ein Polyacrylamidgel und können so der Größe nach aufgetrennt werden. Die SDS-PAGE wurde unter reduzierten Bedingungen im diskontinuierlichen System durchgeführt. Die verwendeten Acrylamidgele (10% *Mini-PROTEAN® TGX™ Gel*, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) hatten eine Konzentration von 10%. Vor der Auftrennung wurden die Proben mit 4x Laemmli Probenpuffer (Bio-Rad) vermischt und für 5 min bei 90°C denaturiert. Der Probenpuffer wurde zuvor mit 10% β -Mercaptoethanol versetzt. Die Proben, sowie ein Proteinmarker (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific, Life Technologies) und ein Western Blot-Standard (*MagicMark™ XP Western Protein Standard*, Invitrogen, Life Technologies) wurden in die vorgesehenen Probentaschen des Gels überführt und bei einer Spannung von 10 V/cm laufen gelassen bis die Banden von Interesse ausreichend getrennt waren. Für die gelelektrophoretische Auftrennung wurde das *Mini-PROTEAN® 3 Cell-System* (Bio-Rad) in 1 x SDS-Laufpuffer (*Tris/Glycine/SDS running buffer*, pH8,3, Bio-Rad) verwendet.

2.2.6.3 Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran

Nach erfolgreicher Trennung wurden die Proteine auf eine *iBlot Transfer Stacks Nitrocellulose-Membran* (Invitrogen, Life Technologies) nach Herstellerangaben übertragen. Der Transfer erfolgte mit dem Programm 0 (1 min bei 20 V, 4 min bei 23 V und 2 min bei 25 V) des *Invitrogen iBlot* (Invitrogen, Life Technologies) für 7 min.

2.2.6.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen mit Antikörper

Die Nitrocellulosemembran wurde nach dem Elektrotransfer für 1 h bei RT in 0,05% *Tris-buffered Saline and Tween-20* -Puffer (TBST-Puffer) versetzt mit 4% Milchpulver geblockt um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu vermeiden. Die Inkubation mit dem

Primärantikörper erfolgte in einer Verdünnung von 1:2500 bis 1:10.000 (siehe Tabelle 12) schwenkend über Nacht bei 4°C. Der sekundäre Meerrettich-Peroxidase (engl. *Horse radish peroxidase*, *HRP*)-gekoppelte Antikörper inkubierte in einer Verdünnung von 1:2500 bis 1:5000 (siehe Tabelle 12) für 1 h schwenkend bei RT. Beide Antikörper wurden in 4% Milchpulver in TBST-Puffer angesetzt. Vor und nach Inkubation des Sekundärantikörpers wurde die Membran je dreimal für 5 min schwenkend mit TBST-Puffer gewaschen. Zur Detektion mittels HRP wurde die Membran nach dem letzten Waschschrift mit *ECL Plus Western Blotting Detection System* (Amersham, GE Healthcare) nach Herstellerangaben versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Das Chemilumineszenz-Signal wurde mit dem *LAS-3000 Luminescent Image Analyzer* (Fujifilm) aufgenommen und digitalisiert.

10x TBS-Puffer (pH 7,6): 200 mM Tris
 1,35 M NaCl

Tabelle 12: Für den Western Blot verwendete Antikörper

Antikörper (Klon)	Spezies	Verdünnung	Hersteller
MYC (Y69)	Kaninchen	1:1000	Abcam
p97-(VCP)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology
Sekundärantikörper, Anti-Kaninchen-HRP-gekoppelt (9846)	Esel	1:2500/5000	Jackson Immuno Research, Laboratories Inc.

2.3 RNA-Techniken

2.3.1 RNA Isolierung und cDNA-Synthese

Gesamt-RNA aus durchflusszytometrisch sortierten Zellen wurden mit dem *peqGOLD MicroSpin Total RNA Kit* (Pqlab, Erlangen, Deutschland) nach Herstellerangaben extrahiert. Die erhaltene RNA wurde für die cDNA-Synthese weiterverwendet. Die cDNA wird dabei mittels des Enzyms Reverse Transkriptase aus RNA synthetisiert. Hierzu wurden *Anchored Oligo dT Primer* (Thermo Scientific, Life Technologies) und das *SensiScript Kit* (QIAGEN, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Literatur
L-1236	cHL peripheres Blut	(Kanzler <i>et al.</i> , 1996a)
KM-H2	cHL Pleural-Erguss	(Kamesaki <i>et al.</i> , 1986)
SUP-HD1	cHL Pleural-Erguss	(Naumovski <i>et al.</i> , 1989)
U-HO1	cHL Pleural-Erguss	(Mader <i>et al.</i> , 2007)

2.4.2 Kultivierung von Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden vom DSMZ in Braunschweig bezogen und bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Als Nährmedium diente RPMI 1640 (GE Healthcare Europe, Freiburg) versetzt mit 10% fötalem Kälberserum (GE Healthcare Europe) und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (PAN Biotech, Aidenbach). U-HO1 Zellen wurden in 80% IMDM (GE Healthcare Europe) und 20% RPMI 1640 Medium, versetzt mit 20% fötalem Kälberserum und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, gehalten. Alle 3 bis 4 Tage wurden die Zellen 5 min bei 150 x g und 4°C zentrifugiert. Ein Teil des Mediums wurde abgenommen und eine entsprechende Menge frisches Medium wurde je nach Zelllinie und zu erreichender Zelldichte hinzugefügt.

2.4.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl sowie zur Unterscheidung vitaler und toter Zellen wurden Verdünnungen von Zellsuspensionen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dafür wurden die Zellsuspensionen mit gleichem Volumen einer 0,5%igen Trypanblau-Lösung (Invitrogen) gemischt und die Neubauer-Zählkammer befüllt. Trypanblau wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen und sie erscheinen im mikroskopischen Bild hell, abgestorbene Zellen dagegen nehmen den Farbstoff auf und werden dadurch dunkelblau angefärbt. Die Neubauerkammer besteht aus vier Großquadraten von denen jedes in 16 Quadrate aufgeteilt ist. Es wurden alle vier Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Dieser Mittelwert wurde dann mit dem Kammerfaktor 10^4 , der sich aus Fläche Großquadrat (1,0 mm²), Höhe Großquadrat (0,1 mm) und Volumen Großquadrat (0,1 mm³ = 10⁻⁴ ml) zusammensetzt, multipliziert. Somit ergibt sich für die Berechnung der Zellzahl folgende Formel: Anzahl der Zellen pro Großquadrat x 10^4 x Verdünnungsfaktor = Zellen/ml.

2.4.4 Durchflusszytometrische Analyse von cHL-Zelllinien

Die durchflusszytometrischen Analysen der cHL-Zelllinien wurden an einem BD FACS-Canto durchgeführt und mit der *FlowJo data analysis software* (FLOWJO, LLC) ausgewertet. Dazu wurden die Zellsuspensionen zweimal mit 5 ml PBS/ 5% BSA gewaschen, indem sie 5 min

bei 200 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml PBS/5% BSA resuspendiert wurde. Zur Vermeidung von Zellaggregaten wurden die Proben auf ein Zellsieb (Maschengröße 45 µm) gegeben und filtriert. Die Zellzahl der Suspensionen wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (siehe 2.4.3) bestimmt und Aliquots von je 0,5 - 1x10⁶ Zellen zum Färben verwendet. Die Zellaliquots wurden in einem Reaktionsvolumen von 100 µl mit dem anti-CD58-PE Antikörper (Verdünnung 1:7, BD Biosciences) und dem FcR Blocking Reagenz (Verdünnung 1:10, Miltenyi Biotec), welches unspezifische Bindungen des Antikörpers verhindern soll, gefärbt. Zusätzlich wurden von jeder Zelllinie Aliquots mit dem Maus anti-Mensch IgD, Isotyp IgG2aκ-PE-Antikörper (Verdünnung 1:7, BD Biosciences) als Isotypkontrolle gefärbt und Zellproben ohne anti-CD58-PE Antikörper als Negativkontrolle verwendet.

3 Ergebnisse

Im vorliegenden Ergebnisteil werden zunächst die Mutationsanalysen des CD58-Gens in HRS-Zellen und die Suche nach Mutationen verschiedener Gene eines Kombinationslymphoms, das aus einem cHL und MCL besteht, beschrieben, bevor verschiedene Analysen zur Charakterisierung von CD30⁺ B-Zellen vorgestellt werden.

Alle drei Abschnitte dieser Arbeit sind Teilbereiche von größeren Studien, die zusammen mit verschiedenen Kooperationspartnern durchgeführt wurden. Zum besseren Verständnis der im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde teilweise auf Vorarbeiten oder Ergebnisse der Kooperationspartner zurückgegriffen oder diese mit eigenen Ergebnissen kombiniert. Alle übernommenen Vorarbeiten und Ergebnisse werden im folgenden Text kenntlich gemacht.

3.1 Suche nach Mutationen im CD58-Gen in HRS-Zellen des cHL

In einer früheren Studie haben Kollegen in Kiel aus der Arbeitsgruppe von Prof. Reiner Siebert (Institut für Humangenetik, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) mehrere Gene mit homozygoten Deletionen in cHL-Zelllinien identifiziert (Giefing *et al.*, 2008). In einer dieser cHL-Zelllinien, KM-H2, wurde für das Adhäsionsmolekül CD58 eine Deletion gefunden. Darüber hinaus wurde erst kürzlich gezeigt, dass Mutationen in *CD58* einen Beitrag zur Immunevasion in den Tumorzellen des DLBCL leisten (Challa-Malladi *et al.*, 2011). *CD58* schien somit auch ein interessanter Kandidat für ein Tumorsuppressorgen im cHL zu sein. In weiteren Analysen mittels Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP)-Chip wurden Deletionen in den beiden cHL-Zelllinien SUP-HD1 und U-HO1 im *CD58*-Gen gefunden. Im Rahmen einer Kooperation validierten und spezifizierten die Kieler Kollegen die homozygoten Deletionen der SUP-HD1- und der U-HO1-Zelllinie mit einer Multiplex-PCR und untersuchten fünf weitere cHL-Zelllinien bezüglich Mutationen in allen sechs kodierenden Exons von *CD58*. Sie bestätigten die homozygote Deletion von Exon 1-3 in den SUP-HD1-Zellen und zusätzlich eine Deletion von Exon 2 und einem großen Teil von Intron 2 in den U-HO1-Zellen. Darüber hinaus beschrieben sie für die Zelllinie KM-H2 eine homozygote Deletion eines Nukleotids innerhalb der 5`Spleißseite in Intron 3. Insgesamt konnten sie für drei von sieben cHL-Zelllinien Mutationen im *CD58*-Gen zeigen. Mittels Reverse Transkriptase (RT)-PCR wurde in Kiel die Expression von *CD58*-mRNA in den sieben cHL-Zelllinien überprüft. Für die Zelllinie SUP-HD1 wurde keine Expression der mRNA von *CD58* nachgewiesen. Die Zelllinie KM-H2 zeigte einen Verlust der Expression von Exon 3 und für die Zelllinie U-HO1 wurde ein Verlust von Exon 2 und 3 gezeigt. Der Verlust von Exon 2 und 3 im *CD58*-Transkript lässt sich wahrscheinlich dadurch erklären, dass zusätzlich zu Exon 2 auch ein großer Teil des Intron 2 deletiert wurde. Dies führte vermutlich dazu, dass die Spleißstelle von Exon 3 mitbetroffen war und somit Exon 1 an

Exon 4 spleißt. Alle anderen cHL-Zelllinien exprimierten Wildtyp CD58-mRNAs. Durch die Kombination immunhistochemischer Färbungen von Gewebeschnitten für CD30 mit Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)-Sonden für den CD58-Locus, auch FICTION-Analyse genannt, war es möglich in drei von 13 cHL-Fällen eine heterozygote Deletion in *CD58* zu identifizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die von uns verwendeten cHL-Zelllinien KM-H2, SUP-HD1 und U-HO1 bezüglich der identifizierten Mutationen mittels PCR untersucht und die Proteinexpression von CD58 auf diesen Zelllinien durchflusszytometrisch analysiert. Darüber hinaus wurden 10 primäre HL-Fälle auf somatische Mutationen überprüft. Dazu wurden PCR- und Sequenzierungsanalysen für die kodierenden Exons von *CD58* in mikrodisssektierten HRS-Zellen durchgeführt.

3.1.1 Mutationsanalyse von *CD58* in HL-Zelllinien

Unsere Kooperationspartner in Kiel hatten bereits durch SNP-Chip-Analysen, Multiplex-PCR und RT-PCR, in drei von sieben cHL-Zelllinien, Deletionen im *CD58*-Gen identifiziert (Tabelle 13). Zur Bestätigung dieser Läsionen wurde genomische DNA der cHL-Zelllinien KM-H2, SUP-HD1 und U-HO1 isoliert und eine *seminested* PCR über zwei Runden für alle sechs kodierenden Exons durchgeführt. Dazu wurde zunächst ein sensitives Zweirunden-PCR-Protokoll etabliert, mit dem es zusätzlich möglich war, in späteren Analysen *CD58* aus geringen Zellmengen zu amplifizieren. Als Positivkontrollen wurden für jedes Exon Reaktionsansätze mit genomischer DNA von CD19⁺ B-Zellen mitgeführt. Zusätzlich dienten zellfreie Reaktionsansätze als Negativkontrollen. Da für die cHL-Zelllinie L-1236 bisher keine Mutationen in *CD58* nachgewiesen werden konnten, diente diese, neben DNA von CD19⁺ B-Zellen, als Positivkontrolle. Die Ergebnisse der Analysen passten sehr gut zu den bereits vorhandenen Ergebnissen der Kieler Kollegen und sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Für die Zelllinie L-1236 wurden, wie erwartet, alle sechs Exons amplifiziert und in der anschließenden Sequenzanalyse wurden keine Mutationen entdeckt. Für die Zelllinie SUP-HD1 wurden erfolgreich die Exone 4-6 amplifiziert, jedoch war es nicht möglich ein PCR-Produkt für die Exone 1-3 zu erhalten. Dies deckt sich sehr gut mit der bereits in Kiel identifizierten Deletion von Exon 1-3 in dieser Zelllinie. Auch für die Zelllinie U-HO1 konnte das Ergebnis aus Kiel bestätigt werden, indem kein PCR-Produkt für Exon 2 ermittelt werden konnte. Die Sequenzierung der Zelllinie KM-H2 bestätigte die homozygote Deletion an Position c.749+1delG der mRNA innerhalb der 5' Spleißstelle in Intron 3 (NCBI/GenBank Referenzsequenz NM_001779). Ein Elektropherogramm der *CD58*-Sequenz der Zelllinie KM-H2 mit der gefundenen Deletion ist in Abbildung 4 dargestellt. Diese Deletion führt zu einem aberranten Spleißvorgang der in einem Verlust von Exon 3 in der mRNA resultiert.

Tabelle 13: Übersicht der Mutationsanalyse von *CD58* in cHL-Zelllinien

Zelllinie	DNA/mRNA (Kiel)	DNA PCR
L-428	Wildtyp	n.a.
HDLM-2	Wildtyp	n.a.
L-540	Wildtyp	n.a.
L-1236	Wildtyp	Wildtyp
SUP-HD1	homozygote Deletion von Exon 1-3 -> keine Expression	kein PCR-Produkt für Exon 1-3
U-HO1	homozygote Deletion von Exon 2 und Teile von Intron 2 -> Exon 1 spleißt an Exon 4	kein PCR-Produkt für Exon 2
KM-H2	homozygote Deletion (c.749+1delG)* (5'Spleiß-Mutation in Intron 3) -> Verlust der Expression von Exon 3	5' Spleiß-Mutation in Intron 3 (c.749+1delG)

*Für die Deletion ist die Position in der DNA-Sequenz (NM_001779) gegeben.

n.a., nicht analysiert

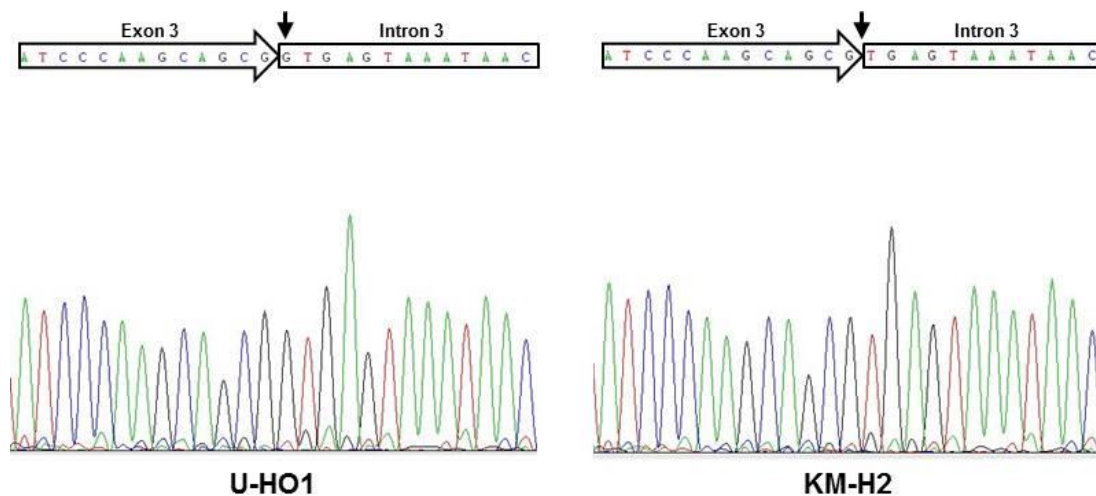


Abbildung 4: Deletion im *CD58*-Gen der cHL-Zelllinie KM-H2

Dargestellt sind Ausschnitte der Elektropherogramme der *CD58*-Sequenzen von den cHL-Zelllinien U-HO1 und KM-H2. Die Sequenz der Zelllinie U-HO1 repräsentiert die Wildtyp-Sequenz und in der Sequenz der KM-H2 ist das Guanin am Beginn des Introns 3 deletiert. Die Pfeile markieren die Stelle des deletierten Guanins.

3.1.2 Proteinexpression von *CD58* in cHL-Zelllinien

Um zu untersuchen welche Auswirkungen die in den cHL-Zelllinien gefundenen Deletionen in *CD58* auf die Proteinexpression haben, wurden Oberflächenfärbungen von *CD58* durchgeführt und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden Aliquots der verschiedenen Zelllinien mit FcR-Blocking-Reagenz und anti-*CD58*-Antikörper angefärbt und

zusätzlich Proben von jeder Zelllinie mit der entsprechenden Isotypkontrolle gefärbt. Wie erwartet zeigte dabei die unmutierte cHL-Zelllinie L-1236 im Histogramm eine starke Rechtsverschiebung der gesamten Zellpopulation im Vergleich zur Isotypkontrolle, was eine starke Expression von CD58 in dieser Zelllinie bedeutet. Im Gegensatz dazu konnte für die Zelllinien SUP-HD1, U-HO1 und KM-H2 keine Oberflächenexpression von CD58 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5).

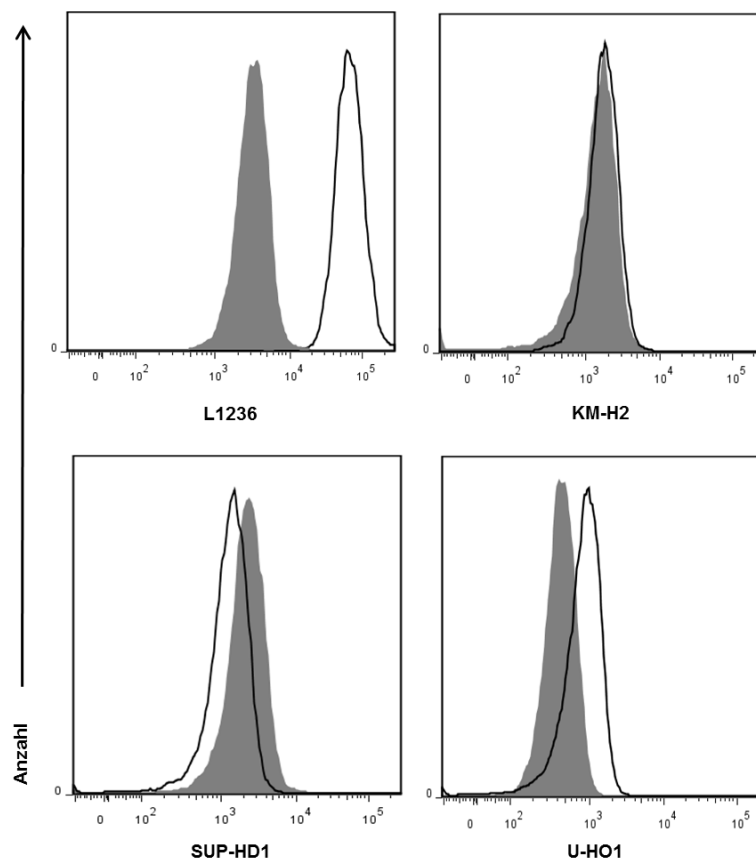


Abbildung 5: Analyse der Proteinexpression von CD58 verschiedener cHL-Zelllinien

Dargestellt ist die Expression von CD58 auf der Oberfläche der cHL-Zelllinien L-1236, KM-H2, SUP-HD1 und U-HO1. Die Zelllinien wurden entweder mit einem PE-markiertem anti-CD58-Antikörper oder mit der entsprechenden Isotypkontrolle gefärbt und am BD FACS-Canto Durchflusszytometer analysiert. Das schattierte Histogramm stellt die Expression der Isotypkontrolle und die schwarze Linie die Expression von CD58 dar.

Die mit anti-CD58-Antikörper gefärbten Zelllinien SUP-HD1, U-HO1 und KM-H2 zeigten im Histogramm, genauso wie die zugehörigen Isotypkontrollen, keine Verschiebung der Zellpopulation nach rechts. Demzufolge führen die verschiedenen Deletionen in allen drei Zelllinien zum Verlust der Ausprägung von CD58.

Zusammengefasst zeigte sich ein rekurrenter Verlust der CD58-Expression in cHL-Zelllinien, der sehr gut mit den Resultaten der CD58-Mutationsanalyse und den gefundenen Deletionen der Kooperationspartner aus Kiel zusammen passt.

3.1.3 Mutationsanalyse von *CD58* in primären cHL-Fällen

Um zu überprüfen, ob Mutationen von *CD58* auch in primären cHL-Fällen auftreten, wurde der Mutationsstatus von 10 cHL-Fällen durch eine *seminested* PCR über zwei Runden mit mikrodisezierten Zellen bestimmt. Darunter befanden sich fünf Fälle vom Subtyp nodulär-sklerosierend und fünf Fälle gemischtzelliges cHL. Die gemischtzelligen cHLs waren alle EBV positiv. Für die Analyse wurde zunächst eine PCR mit WGA-Produkt von 200 Zellen pro Fall für alle sechs kodierenden Exons des *CD58*-Gens durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde für jedes der 6 Exons genomische DNA von *CD19*⁺ B-Zellen mitgeführt. Zusätzlich dienten zellfreie Reaktionsansätze als Negativkontrolle. Die Kontrollen wurden in beiden PCR-Runden mitgeführt. Für die 10 cHL-Fälle konnten alle kodierenden Exons von *CD58* amplifiziert und anschließend sequenziert werden. In zwei Fällen (3 und 6) wurde je ein homozygoter Einzel-Nukleotidaustausch im 5'-untranslatierten Bereich von Exon 1 nachgewiesen. Ein weiterer Fall (7) zeigte zunächst einen Einzel-Nukleotidaustausch in Exon 2, dieser konnte jedoch in einer Wiederholungs-PCR mit einer weiteren WGA-Probe nicht bestätigt werden. Acht der 10 untersuchten Fälle zeigten somit eine Wildtyp-Sequenz für *CD58*. Im Anschluss sollten die beiden Mutationen durch die Analyse von Ein- oder Zweizellproben der HRS-Zellen bestätigt werden. Zusätzlich sollten 5 weitere der 10 cHL-Fälle mit Ein- oder Zweizellproben der HRS-Zellen untersucht werden, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass durch Verwendung der WGA evtl. Mutationen übersehen wurden, z.B. durch nicht Amplifizierung eines mutierten Allels in der WGA. Dazu wurde eine *seminested* PCR über zwei Runden der cHL-Fälle durchgeführt, allerdings ohne zuvor eine WGA durchzuführen. Auch hier wurde als Positivkontrolle genomische DNA von *CD19*⁺ B-Zellen verwendet. Mikrodisezierte Nicht-Tumorzellen dienten als Keimbahnkontrolle und zellfreie mit Wasser versetzte Reaktionsansätze als Negativkontrolle. Die Kontrollen wurden in beiden PCR-Runden mitgeführt. Von jedem Exon und pro Fall wurden 4-7 PCR-Produkte aus unabhängigen Zweizellproben sequenziert und analysiert. Eine Ausnahme stellte Exon 6 von Fall 3 dar, von dem nur drei PCR-Produkte sequenziert werden konnten und Exon 1 und 6 von Fall 7 von denen auch nur drei PCR-Produkte untersucht werden konnten. Für diese Exons war es nicht möglich genügend PCR-Produkte zu amplifizieren oder auswertbare Sequenzen zu erstellen. In keinem der untersuchten cHL-Fälle konnte eine *CD58*-Mutation nachgewiesen werden. Auch die beiden Einzel-Nukleotidaustausche, die zuvor in den WGA-Proben der Fälle 3 und 6 gefunden wurden, konnten nicht bestätigt werden. Dies lässt vermuten, dass es sich dabei um Artefakte handelte, die durch die WGA eingefügt wurden. Somit weist, im Gegensatz zu den cHL-Zelllinien, keiner der 10 analysierten primären cHL-Fälle, eine Mutation im *CD58*-Gen auf. Die Ergebnisse der Mutationsanalyse von *CD58* in primären HRS-Zellen wurden in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: CD58-Mutationsanalyse von primären cHL-Fällen

cHL-Fall	Sub- typ	EBV Status	Mutationen in WGA-Proben ¹	Mutationen in Ein-/ Zweizellproben
1	NS	-	Keine	Keine
2	MC	+	Keine	Keine
3	MC	+	homozygoter Einzel-Nukleotidaustausch (c.- 107C>T), nicht in CDS	Keine
4	NS	-	Keine	Keine
5	NS	-	Keine	Keine
6	NS	-	homozygoter Einzel-Nukleotidaustausch (c.- 45G>A), nicht in CDS	Keine
7	NS	-	Keine	Keine
8	MC	+	Keine	n.a.
9	MC	+	Keine	n.a.
10	MC	+	Keine	n.a.

Von den unterschiedlichen cHL-Fällen sind cHL-Subtyp und EBV-Status mitangegeben.

¹Für die Mutation ist die Position in der DNA-Sequenz (NM_001779) gegeben.

n.a., nicht analysiert; CDS, kodierender Bereich der DNA Sequenz

3.2 Molekulare Pathogenese eines Kombinationslymphoms bestehend aus einem cHL und MCL

Kombinationslymphome sind sehr seltene Kombinationen aus einem HL und einem NHL oder zwei NHLs, die meistens gleichzeitig auftreten. Durch den Nachweis identischer IgV-Genumlagerungen in beiden Lymphomen, konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass Kombinationslymphome häufig klonal miteinander verwandt sind (Küppers *et al.*, 2014). Oftmals waren die IgV-Gene somatisch mutiert und zeigten sowohl gemeinsame als auch individuelle Mutationen zwischen den beiden Lymphomarten. Dies lässt vermuten, dass beide Lymphome von einer gemeinsamen Vorläuferzelle abstammen, und dass die Entwicklung in die verschiedenen Lymphome zum Teil oder ganz im GC stattgefunden hat. Kombinationslymphome stellen somit interessante Modelle dar, um durch die Analyse transformierender Ereignisse, Einblicke in die Mehrschrittpathogenese der Lymphomentstehung zu erhalten und um Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den beteiligten Lymphomarten besser zu verstehen. In Kooperation mit Kollegen aus Italien (Institut für Hämatologie, Universität von Perugia) und aus Frankfurt (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main), wurde ein Kombinationslymphom, bestehend aus einem cHL und MCL, bezüglich seiner Klonalität und auf transformierende Ereignisse hin untersucht. Zunächst wurden die Tumorzellen beider Lymphome mittels Mikrodisektion isoliert und im Rahmen dieser Arbeit genetisch untersucht. Dazu wurde mittels IgV-Gen-PCR, die klonale Verwandtschaft der beiden Lymphome zueinander überprüft (siehe 3.2.1), und in verschiedenen Genen, die oft in der Pathogenese vom cHL oder MCL eine Rolle spielen, nach Mutationen gesucht (siehe 3.2.2). Parallel dazu führten unsere Kooperationspartner in Italien immunhistochemische Analysen zur phänotypischen Charakterisierung des Kombinationslymphoms durch. So konnten die HRS-Zellen als große, mehrkernige Zellen mit prominentem Zellkern und typischen Immunphänotyp klar von den

kleinen MCL-Zellen mit unauffälligem Zellkern und einem MCL-typischen Immunphänotyp unterschieden werden. Interessanterweise zeigten die HRS-Zellen auch eine stetige Expression der Marker Cyclin D1 und SOX11, die normalerweise typisch sind für die Zellen des MCL und in HRS-Zellen seltener ausgeprägt werden (Mozos *et al.*, 2009). Zusätzlich waren die meisten HRS-Zellen auch positiv für OCT2, das nur sehr selten von HRS-Zellen ausgeprägt wird (Stein *et al.*, 2001). Für einige Gene, die typischerweise Aberrationen der chromosomalen Kopienzahl im cHL oder MCL aufweisen, wurden FISH-Analysen durchgeführt. Dabei wurden für *JAK2*, *REL*, *TNFAIP3*, *CDKN2A-B* und *ATM* keine Aberrationen gefunden. Die FISH-Analysen für *TP53* zeigten hingegen in 90% der MCL-Zellen und 100% der HRS-Zellen eine heterozygote Deletion. Darüber hinaus wurde mit Hilfe der FISH-Analyse, die für das MCL charakteristische *CCND1/IGH*-Translokation identifiziert. Interessanterweise wurde diese nicht nur in den MCL-Zellen gefunden, sondern auch in den HRS-Zellen des Kombinationslymphoms, was auf eine klonale Verwandtschaft beider Lymphome hindeutet. Der genaue Translokationsbruchpunkt wurde anschließend in beiden Lymphomen von Markus Schneider aus unserer Arbeitsgruppe mittels Langstrecken-Inverse-(LDI)-PCR und PCR mit bruchpunktumfassenden Primern ermittelt. Der Bruchpunkt ist 107 kb stromaufwärts von *CCND1* auf Chromosom 11 und im JH4-Gensegment auf Chromosom 14 lokalisiert.

3.2.1 IgV-Genanalyse von HRS- und MCL-Zellen des Kombinationslymphoms

Mit Hilfe der Mutationsanalyse von IgV-Genen und dem Vergleich der erhaltenen Sequenzen erhält man Informationen über die klonale Verwandtschaft der zu untersuchenden HRS- und MCL-Zellen. Die IgV-Genumlagerungen der B-Zellen sind einzigartig und stellen somit einen klonalen Marker dar. Zusätzlich lässt sich auf diese Weise der Differenzierungsgrad der zu untersuchenden Zellen bestimmen. Während naive B-Zellen unmutierte IgV-Genumlagerungen aufweisen, werden GC- und Post-GC-B-Zellen durch mutierte IgV-Genumlagerungen charakterisiert. In der Regel kann auch die Teilnahme der Zellen an der GC-Reaktion durch die IgV-Genanalyse nachgewiesen werden, denn durch die somatische Hypermutation im GC zeigen B-Zell-Klone intraklonale Diversität. Um die klonale Verwandtschaft der beiden Lymphome des Kombinationslymphoms zu bestätigen und zur Charakterisierung der V-Genumlagerungen wurden mikrodyssektierte HRS- und MCL-Zellen durch eine *seminested* IgV-Gen PCR mit familienspezifischen Primern (VHL1-VHL6) auf VH-Genumlagerungen hin untersucht. Insgesamt wurde die PCR mit 19 HRS-Zellproben (zwei Zellen pro Probe) und mit 7 MCL-Zellproben (10 Zellen pro Probe) durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden für jede IgV-Genfamilie Ansätze mit sortierten Einzelzellen und/oder Ansätze von zehn Zellen, sowie in der zweiten Runde der PCR genomische DNA, mitgeführt.

Bei den Kontrollzellen handelte es sich um Zellen von monoklonalen B-Zelllinien, deren IgV-Genumlagerungen bekannt waren, und um genomische DNA die aus denselben Zelllinien gewonnen wurde, sowie aus CD19⁺ B-Zellen. Zusätzlich dienten zellfreie Reaktionsansätze als Negativkontrolle. Im Falle von negativen Positivkontrollen wurde die PCR wiederholt. Nur für fünf der 19 analysierten HRS-Zellproben konnte die folgende IgV-Genumlagerung nachgewiesen werden: VH3-66/DH1-26/JH4.

Tabelle 15: IgV-Genanalyse der HRS- und MCL-Zellen

Die HRS- und MCL-Zellen tragen die identische V-Genumlagerung mit einer Mutationsfrequenz von 2,8%.

Lymphom	Anzahl der positiven PCR-Proben	IgV-Genumlagerung	Mutationsfrequenz (%)	Gemeinsame und individuelle IgV-Gen Mutationen
MCL	5 ¹	VH3-66/DH1-26/JH4	2,8	gemeinsame/ evtl. eine Individuelle
HL	5 ²	VH3-66/DH1-26/JH4	2,8	gemeinsame

¹5 von 7 analysierten Zellproben

²5 von 19 analysierten Zellproben

Die gleiche IgV-Genumlagerung wurde in fünf MCL-Zellproben detektiert (siehe Abbildung 6 und Tabelle 15). Eine mögliche Erklärung für die geringe Effizienz der PCR im Fall der HRS-Zellen könnte sein, dass Teile des relativ großen Zellkerns während der Mikrodissektion abgeschnitten oder durch den Laser zerstört wurden, wodurch Teile des Genoms der Zelle fehlten und somit kein *template* in der PCR zur Verfügung stand. Alle erhaltenen Sequenzen waren somatisch mutiert mit einer Mutationsfrequenz von 2,8%, was darauf hinweist, dass die analysierten Zellen die GC-Reaktion durchlaufen haben. Die somatischen Mutationen waren in allen Sequenzen identisch mit der Ausnahme einer Punktmutation in einer der MCL-Sequenzen. Ob es sich dabei um eine reale Mutation oder um ein technisches Artefakt handelte, konnte nicht eindeutig geklärt werden (siehe Abbildung 6). Die Tatsache, dass von allen analysierten Sequenzen nur eine Sequenz eine einzige Mutation trägt, unterstützt eher die Hypothese, dass es sich um ein Artefakt handelt. Im Falle von intraklonaler Diversität wären normalerweise mehr individuelle Mutationen zu erwarten. Die gemeinsame klonale IgV-Genumlagerung und das Auftreten von somatischen Mutationen in beiden Zelltypen, bestätigen ihre klonale Verwandtschaft und zeigen, dass sich beide Lymphome aus einer gemeinsamen (Post-)GC-Vorläuferzelle entwickelt haben.

	INTRON-																														
V3-66	C G A G T G T G A G T G A A G A T G A G T G A G A G A A A C A G T G G A T A T G T G T G G C A G T T T C T G A C C A A T G T C T C T G T G T T T G C A G G T G T C C A G T G T																												GAG	GTG	
HRS1-5G.....																												.A	...	
MCL1-4G.....																												.A	...	
MCL5G.....																												.A	...	
																														<-----	
V3-66	CAG	CTG	GTG	GAG	TCT	GGG	GGA	GGC	TTG	GTC	CAG	CCT	GGG	GGG	TCC	CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA							
HRS1-5							
MCL1-4							
MCL5							
																														-----CDR1----->	
V3-66	TTC	ACC	GTC	AGT	AGC	AAC	TAC	ATG	AGC	TGG	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	GTC	TCA	GTT							
HRS1-5G.T.C.C							
MCL1-4G.T.C.C							
MCL5G.T.C.C							
																														<-----CDR2----->	
V3-66	ATT	TAT	AGC	GGT	GGT	AGC	ACA	TAC	TAC	GCA	GAC	TCC	GTG	AAG	GGC	AGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAT	TCC							
HRS1-5	C.							
MCL1-4	C.							
MCL5	C.	A.							
																														<-----	
V3-66	AAG	AAC	ACG	CTG	TAT	CTT	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	GCC	GAG	GAC	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA	GA							
HRS1-5A	G.CC							
MCL1-4A	G.C.							
MCL5A	G.C.							
																														-----CDR3----->	
JH4	AC TAC TTT GAC TAC TGG																														
HRS1-5	CTT	AAT	AGT	GGG	AGC	T..	CCT																				
MCL1-4	CCT																				
MCL5	CCT																				

Abbildung 6: Nukleotidsequenz der identifizierten VH3-66-Umlagerung der analysierten HRS- und MCL-Zellen

Gezeigt sind die ermittelten Sequenzen, verglichen zur Keimbahnsequenz vom VH3-66- und JH4-Gen. Die dargestellten Punkte zeigen die Sequenzhomologien, darüber hinaus ist das Leitpeptid-Intron, sowie die CDR1-CDR3 des Gens gekennzeichnet. Abgebildet werden alle gemeinsamen Mutationen, sowie die individuelle Mutation in der MCL-Probe 5. HRS1-5 umfassen die 5 analysierten HRS-Zellen und MCL1-5 die untersuchten MCL-Zellen.

3.2.2 Suche nach gemeinsamen und separaten Mutationen in den HRS- und MCL-Zellen des Kombinationslymphoms

Um die Pathogenese des Kombinationslymphoms besser zu verstehen, wurde nach gemeinsamen und separaten Mutationen in den HRS- und MCL-Zellen gesucht. Aufgrund der Tatsache, dass die Gene *TNFAIP3*, *NFKBIA* und *SOCS1* regelmäßig im cHL mutiert sind (Küppers, 2009) und sich für *NOTCH1* oftmals Mutationen im MCL nachweisen lassen (Kridel *et al.*, 2012) wurde in WGA-Proben und mikrodisezierten Ein- oder Zweizellproben der HRS- und MCL-Zellen nach Mutationen in diesen Genen gesucht.

3.2.2.1 Mutationsanalyse von *TNFAIP3* und *NFKBIA*

Die konstitutive Aktivität des NF- κ B-Signalweges ist ein charakteristisches Merkmal der HRS-Zellen im cHL und für ihr Überleben von großer Bedeutung (siehe 1.4.1) (Bargou *et al.*, 1997). Unter anderem können inaktivierende Mutationen in Genen der NF- κ B-Inhibitoren *TNFAIP3* oder *NFKBIA* für die Aktivierung dieses Signalweges verantwortlich sein (Jungnickel *et al.*, 2000; Emmerich *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 2009; Lake *et al.*, 2009; Schmitz *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010).

TNFAIP3 kodiert für das ubiquitin-modifizierende Enzym A20, das eine wichtige Rolle bei der Inhibierung von TNF- und Toll-ähnliche Rezeptor vermittelter NF- κ B-Aktivierung spielt. Die Polyubiquitinierung des Rezeptor-interagierenden Faktors RIP1 ist notwendig für die Aktivierung des IKK-Komplexes nach TNF-Rezeptor-Stimulation. A20 entfernt aktivierte K63-gekoppelte Polyubiquitinketten von RIP1 und fügt Lys48-gekoppelte Polyubiquitinketten an RIP1 an. Dadurch wird das RIP1-Protein für die Degradierung durchs Proteasom markiert (Wertz *et al.*, 2004). *TNFAIP3* ist auf Chromosom 6q23 lokalisiert und zeigt in 60% der EBV⁺-cHL-Fälle inaktivierende Mutationen (Küppers, 2009). Zusätzlich wurden auch für 15% der MCLs Mutationen in *TNFAIP3* beschrieben (Honma *et al.*, 2009). Somit ist *TNFAIP3* ein bedeutendes Tumorsuppressorgen in beiden Lymphomarten.

NFKBIA ist auf Chromosom 14q13 lokalisiert und kodiert für I κ B α . I κ B α verhindert die Translokation von NF- κ B Homo- oder Heterodimeren vom Zytoplasma in den Zellkern, indem es an sie bindet. Dadurch wird der NF- κ B-Signalweg gestört (Küppers, 2009). Inaktivierende Mutationen von *NFKBIA* wurden für HL-Zelllinien und in ungefähr 20% primärer cHL-Fälle beschrieben (Küppers, 2009).

Für alle kodierenden Exons (Exons 2-9) von *TNFAIP3* wurde eine *seminested* PCR über zwei Runden mit 10 ng WGA Proben und mikrodisektierte Ein- oder Zweizellproben beider Tumorbestandteile durchgeführt. Zunächst wurde die PCR mit den WGA-Proben der HRS- und MCL-Zellen durchgeführt, die Exons 2-9 erfolgreich amplifiziert und sequenziert. Als Negativkontrolle dienten DNA-freie Wasserproben. Alle analysierten Exons waren unmutiert. Um die Ergebnisse der WGA zu überprüfen und möglicherweise während der WGA entstandene Fehler auszuschließen, wurde anschließend in mikrodisektierte HRS- und MCL-Zellen nach Mutationen in den Exons 2-9 von *TNFAIP3* gesucht. Als Positivkontrollen wurden für jedes Exon sortierte Einzelzellen bzw. in der zweiten Runde genomische DNA lymphoblastoider Zelllinien verwendet. Mikrodisektierte Nicht-Tumorzellen dienten als Keimbahnkontrolle und zellfreie mit Wasser versetzte Reaktionsansätze als Negativkontrolle. Die Kontrollen wurden in beiden PCR-Runden mitgeführt und es wurden 4-6 PCR-Produkte unabhängiger Zellaliquots von jedem Exon sequenziert und analysiert. Im Falle einer positiven Wasserkontrolle wurden alle Proben verworfen und die PCR mit neuen Reagenzien wiederholt. Bei der Analyse wurden keine Mutationen für *TNFAIP3* in den HRS- und MCL-Zellen des Kombinationslymphoms entdeckt (siehe Tabelle 16).

Für die Mutationsanalyse von *NFKBIA* wurde ebenfalls eine *seminested* PCR mit 10 ng WGA-Probe der HRS- und MCL-Zellen durchgeführt. Als Positivkontrolle diente in beiden Runden der PCR genomische DNA der cHL-Zelllinie L-1236, die unmutiert im *NFKBIA*-Gen ist. Zellfreie Reaktionsansätze wurden als Negativkontrolle mitgeführt und Nicht-Tumorzellen als Keimbahnkontrolle. Die kodierenden Exons 1-6 von *NFKBIA* wurden amplifiziert und

anschließend sequenziert. Sowohl die Doppelansätze der WGA-Proben der HRS-Zellen, als auch die der MCL-Zellen waren unmutiert (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Zusammenfassung der Mutationsanalyse von *TNFAIP3* und *NFKBIA*

Analysierte Proben	Gen	HRS-Zellen	MCL-Zellen
WGA-DNA	<i>NFKBIA</i> (Exon1-6)	Wildtyp	Wildtyp
WGA-DNA	<i>TNFAIP3</i> (Exon 2-9)	Wildtyp	Wildtyp
Mikrodissektierte Ein- oder Zweizellproben ¹	<i>NFKBIA</i> (Exon 2-9)	Wildtyp	Wildtyp

¹Je Zelltyp wurden mindestens vier Sequenzen unabhängiger Zellaliquots analysiert

3.2.2.2 Mutationsanalyse von *SOCS1*

Der JAK/STAT-Signalweg ist ebenfalls konstitutiv aktiv im cHL (siehe 1.4.1). Unter anderem sind dafür inaktivierende Mutationen im *SOCS1*-Gen verantwortlich, die in 40% aller cHL-Fälle nachgewiesen wurden (Weniger *et al.*, 2006).

SOCS1 kodiert für das Protein *Suppressor of Cytokine Signaling 1* (*SOCS1*), welches zu einer Gruppe induzierbarer Feedback-Inhibitoren des JAK/STAT-Signalweges gehört. Es reguliert die Kinaseaktivität von Januskinasen (JAK1, JAK2, JAK3, und TYK2) herunter, indem es mit seiner SH2 (*Src-homology 2*)-Domäne an das katalytische Zentrum der phosphorylierten JAKs bindet. Zusätzlich führt es zur Ubiquitinierung von phosphorylierten JAKs und somit zu deren proteosomalen Abbau. *SOCS1* wird durch aktivierte STATs induziert und ist somit Bestandteil einer negativen Rückkopplung des JAK-STAT-Signalweges (Krebs & Hilton, 2001).

Zur Analyse von *SOCS1*-Mutationen in den HRS- und MCL-Zellen des Kombinationslymphoms wurde von WGA- und Zweizellproben der kodierende Bereich (Exon 2) von *SOCS1* amplifiziert und sequenziert. Reaktionsansätze mit genomischer DNA einer lymphoblastoiden Zelllinie dienten dabei als Positivkontrolle, Nicht-Tumorzellen als Keimbahnkontrolle und DNA-freie Ansätze als Negativkontrolle. Sowohl in den WGA-Proben, als auch in den HRS- und MCL-Zellproben, von denen jeweils vier unabhängige Amplifikate untersucht wurden, konnte keine Mutation in *SOCS1* nachgewiesen werden (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Mutationsanalyse von Exon 2 des *SOCS1*-Gens

Analysierte Proben	HRS-Zellen	MCL-Zellen
WGA-Probe	Wildtyp	Wildtyp
Mikrodissektierte Zweizellproben ¹	Wildtyp	Wildtyp

¹Je Zelltyp wurden vier Sequenzen unabhängiger Zellaliquots analysiert.

3.2.2.3 Mutationsanalyse von *NOTCH1*

Der Notch-Signalweg ist ein stark konservierter Signaltransduktionsweg, durch den Zellen auf äußere Signale reagieren können. Aktiviert wird der Notch-Signalweg durch die Bindung des Liganden Delta an den Notch-Rezeptor. Das Gen *NOTCH1* ist auf Chromosom 9 lokalisiert. Es kodiert für ein Transmembranprotein mit nur einer Transmembrandomäne und funktioniert als Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor. Im MCL wurden aktivierende *NOTCH1*-Mutationen in 12% der Patienten (14/121) und in 20% der MCL-Zelllinien (2/10) nachgewiesen (Kridel *et al.*, 2012). Auch in den HRS-Zellen des cHL ist *NOTCH1* ausgeprägt. Er ist ein essentieller vorgeschalteter Regulator von NF- κ B und wichtig für das Überleben von HRS-Zellen (Schwarzer *et al.*, 2012). Seine Aktivierung führt zu einem erhöhten Wachstum und verringerter Apoptose in den HRS-Zellen. Es wurde gezeigt, dass im cHL *NOTCH1* in der Lage ist, die Ausprägung B-Zell-spezifischer Gene wie z.B. *E2A* und *EBF* zu unterdrücken und die Expression von Genen in HRS-Zellen, die für andere Zelltypen charakteristisch sind, wie z.B. *GATA3*, zu induzieren (Jundt *et al.*, 2008; Stanelle *et al.*, 2010).

Um den Mutationsstatus von *NOTCH1* im Kombinationslymphom zu analysieren, wurden von den 34 kodierenden Exons Bereiche ausgewählt (Exon 26, 28 und der Anfang von Exon 34), die am häufigsten Mutationen aufweisen (Kridel *et al.*, 2012). Aufgrund seiner Größe wurde der kodierende Bereich von Exon 34 in drei Abschnitten amplifiziert. Fünfzig ng WGA-Produkt der HRS- und MCL-Zellen wurden für die PCR eingesetzt. Die PCR-Bedingungen wurden aus Stanelle *et al.*, 2010 übernommen und vorher mit genomischer DNA der cHL-Zelllinien L-1236 und U-HO1 ausgetestet. Als Positivkontrolle dienten diese beiden cHL-Zelllinien. Die mitgeführten Wasserkontrollen waren stets negativ. Die Ergebnisse der anschließenden Sequenzanalyse der PCR-Produkte ist in Tabelle 18 zusammengefasst. In Exon 26 konnte keine Mutation nachgewiesen werden. In Exon 28 der MCL-Zellen wurde ein stiller homozygoter Nukleotidaustausch von C zu T an Position 5271 der genomischen Referenzsequenz für *NOTCH1* (NCBI/GenBank Referenzsequenz NG_007458.1) gefunden. Dieser konnte allerdings in einer Wiederholung der PCR mit einer neuen WGA-Probe nicht bestätigt werden. Um diese Unstimmigkeit zu überprüfen, wurde Exon 28 mit einer Zweirunden-PCR mit 10 oder 50 mikrodisezierten MCL-Zellen in Doppelansätzen wiederholt. Die Sequenzanalyse ergab keine Mutation für Exon 28, somit handelt es sich bei dem zuerst gefundenen Nukleotidaustausch um ein Artefakt der WGA. Sowohl in der WGA-Probe der HRS-Zellen, als auch in beiden WGA-Proben der MCL-Zellen wurde ein bekannter SNP in Exon 34 gefunden. Diese Nukleotidvariante rs2229974 mit einem homozygoten Genotyp (T/T) befindet sich an Position 53603 der genomischen Referenzsequenz für *NOTCH1* (NCBI/GenBank Referenzsequenz NG_007458.1).

Zusammenfassend wurde im NOTCH1-Gen keine Mutation im Kombinationslymphom gefunden.

Tabelle 18: Mutationsanalyse des NOTCH1-Gens im Kombinationslymphom

Analysierte Proben	Exon 26	Exon 28	Exon 34.1	Exon 34.2	Exon 34.3
WGA-DNA der HRS-Zellen	Wildtyp	Wildtyp	homozygoter SNP ²	Wildtyp	Wildtyp
WGA-DNA I der MCL-Zellen	Wildtyp	homozygoter Nukleotidaustausch ¹	homozygoter SNP ²	Wildtyp	Wildtyp
WGA-DNA II der MCL-Zellen	n.a.	Wildtyp	homozygoter SNP ²	n.a.	n.a.
10 und 50 mikrodisektierte MCL-Zellen	n.a.	Wildtyp	n.a.	n.a.	n.a.

¹homozygoter Nukleotidaustausch von C zu T an Position 5271 der genomischen Referenzsequenz für *NOTCH1* (NCBI/GenBank Referenzsequenz NG_007458.1)

²bekannter SNP rs2229974 mit einem homozygoten Genotyp (T/T) befindet sich an Position 53603 der genomischen Referenzsequenz für *NOTCH1* (NCBI/GenBank Referenzsequenz NG_007458.1).

n.a., nicht analysiert

3.2.2.4 Mutationsanalyse von *TP53*

Das Tumorsuppressorgen *TP53* ist auf Chromosom 17 lokalisiert und kodiert für das Tumorprotein P53. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus und bei der Einleitung der Apoptose. Mutationen können z.B. zu einem Funktionsverlust von *TP53* führen, wodurch ein Anhalten des Zellzyklus zur DNA-Reparatur und auch die Induktion der Apoptose nicht mehr möglich sind. Bei *TP53* handelt es sich um eines der am häufigsten mutierten Gene in menschlichen Krebserkrankungen. So finden sich auch in 15% der MCLs inaktivierende Mutationen in *TP53*, die gewöhnlich mit 17p-Deletionen einhergehen (Greiner *et al.*, 1996; Hernandez *et al.*, 1996). Auch in den HRS-Zellen des cHL sind *TP53*-Mutationen in seltenen Fällen gezeigt worden (Montesinos-Rongen *et al.*, 1999; Maggio *et al.*, 2001; Feuerborn *et al.*, 2006).

Die FISH-Analysen unserer Kooperationspartner für *TP53* zeigten in 90% der MCL-Zellen und in 100% der HRS-Zellen eine heterozygote Deletion. Dabei wurden für die HRS-Zellen drei unterschiedliche Signalmuster beschrieben, die alle auf die Deletion eines *TP53*-Allels hindeuten. Das Hauptsignalmuster in den HRS-Zellen zeigte drei Signale für Chromosom 17 und nur zwei Signale für *TP53*.

Um in den übrigen *TP53*-Allelen nach Mutationen zu suchen, wurde eine *seminested* PCR über zwei Runden für Exon 4-8 von zwei unterschiedlichen WGA-Proben der HRS- und MCL-Zellen durchgeführt. Da der überwiegende Teil der bereits beschriebenen *TP53*-Mutationen in den Exons 4-8 gefunden wurde, beschränkten sich die Analysen auf diese Bereiche. Als Positivkontrolle wurde genomische DNA von Zellen lymphoblastoiden

Zelllinien verwendet und als Negativkontrolle dienten mit Wasser anstatt DNA versehende Reaktionsansätze. Die Auswertung der ermittelten Sequenzen ergab keine Mutationen für Exon 4, 6, 7 und 8. Allerdings wurde in beiden Lymphomproben eine gleiche Austauschmutation in Exon 5 gefunden. Die Punktmutation zeigt einen Nukleotidaustausch von A zu G an Position 17427 der DNA, resultierend in einen Aminosäureaustausch von Tyrosin zu Cystein an Position 163 des P53-Proteins (NCBI/GenBank Referenzsequenz NG_017013.2) (siehe Tabelle 19). Dabei wurde in den beiden WGA-Proben der MCL-Zellen nur die mutierte Sequenz gefunden, was sehr gut mit der in den FISH-Analysen beschriebenen Deletion auf dem zweiten Allel zusammenpasst. Im Gegensatz dazu zeigte eine WGA-Probe der HRS-Zellen nur die mutierte Sequenz und die andere WGA-Probe sowohl ein mutiertes als auch ein Wildtyp-Allel. Zusammen mit den Ergebnissen der FISH-Analysen lässt dies vermuten, dass die HRS-Zellen trotz der Deletion eines *TP53*-Allels, noch zwei Allele für *TP53* besitzen von denen eines mutiert ist. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden Zweizellproben von HRS- und MCL-Zellen ohne vorhergegangene WGA analysiert. Um zu zeigen, dass es sich hierbei um eine somatische Mutation handelt, wurden zusätzlich CD3⁺ Nicht-Tumorzellen (T-Zellen) des Kombinationslymphoms untersucht.

Tabelle 19: Sequenzergebnisse von Exon 5 des TP53-Gens

Zusammenfassung der Sequenzanalyse von Exon 5 des TP53-Gens. Sowohl in den HRS-Zellen als auch in den MCL-Zellen wurde eine Mutation in Exon 5 an Position 17427 der DNA gefunden. Dargestellt ist eine Übersicht des Mutationsstatus in den einzelnen Zelltypen.

Zelltyp	Art der Probe	Positive Proben/ analysierte Proben	Sequenzergebnis für Exon 5 Codon 163 ¹		
			mutiert	mutiert & Wildtyp	Wildtyp
HRS-Zellen	WGA	2/2	1	1	
	Zweizellprobe	19/24	7	7	5
MCL-Zellen	WGA	2/2	2		
	Zweizellprobe	11/18	9	1	1
T-Zellen	Zweizellprobe	12/15	1	1	10

¹Mutationsstatus für die *TP53*-Mutation (A >G) in Exon 5 an Position 17427 der DNA, die zu einem Austausch der Aminosäure Tyrosin zu einem Cystein an Position 163 (NCBI/GenBank Referenzsequenz NG_017013.2) führt.

Insgesamt wurden 18 MCL-Proben für die Analyse eingesetzt, von denen 11 PCR-Produkte ausgewertet werden konnten. Neun von 11 Sequenzen der MCL-Proben zeigten nur das mutierte Allel (siehe

Tabelle 19 und Abbildung 7), was die Sequenzergebnisse der WGA-Proben bestätigt und zeigt, dass das nicht-deletierte Allel von *TP53* mutiert ist. Bei den HRS-Zellen brachten 19

von 24 eingesetzten Proben auswertbare Sequenzen hervor. Von diesen 19 Sequenzen zeigten sieben ein gemischtes Signal im Elektropherogramm an der mutierten Stelle. Weitere sieben Sequenzen trugen nur das mutierte Allel und in fünf Proben wurde nur die Wildtyp-Sequenz identifiziert (siehe Tabelle 19 und Abbildung 7). Auch die Ergebnisse der untersuchten HRS-Zellen bestätigen die Analysen der WGA-Proben und zeigten, dass die HRS-Zellen, dieselbe *TP53*-Mutation wie die MCL Zellen aufweisen. Zusätzlich besitzen die HRS-Zellen trotz der Deletion noch ein Wildtyp-Allel für *TP53*.

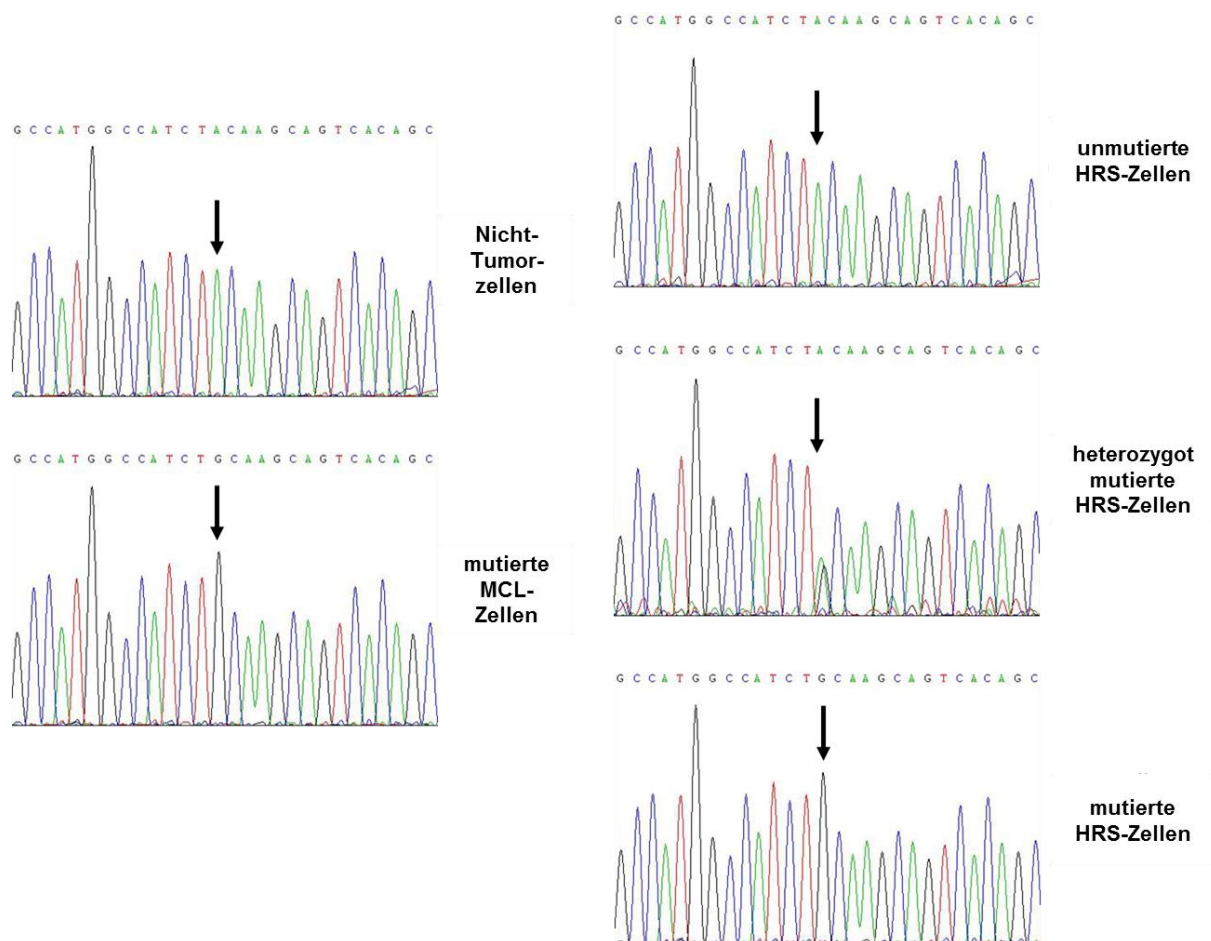


Abbildung 7: Sequenzen der *TP53*-Analyse von HRS-, MCL- und $CD3^+$ Nicht-Tumorzellen

Dargestellt sind repräsentative Elektropherogramme der HRS-, MCL- und $CD3^+$ Nicht-Tumorzellen. Die Nicht-Tumorzellen zeigen die Keimbahnkonfiguration und die MCL-Zellen die homozygote Mutation (A>G). Für die HRS-Zellen sind die drei unterschiedlichen Sequenzergebnisse, die eine heterozygote Mutation an derselben Position andeuten, exemplarisch dargestellt. Die Pfeile kennzeichnen die Position der Mutation.

Eine mögliche Erklärung für die Proben, die in den einzelnen HRS-Zellen nur die Wildtyp- oder nur die mutierte Sequenz zeigten, ist, dass durch die Größe der HRS-Zellen bei der Anfertigung der Schnitte und anschließender Mikrodissektion nur Teile des Zellkern isoliert wurden und dadurch nicht immer alle Allele von *TP53* isoliert wurden. Somit konnten diese auch nicht nachgewiesen werden. Neben den mutierten Sequenzen wurde in einer der 11

MCL-Proben eine Wildtyp-Sequenz zusammen mit einem mutierten *TP53*-Allel gefunden und eine weitere Probe zeigte nur die unmutierte Sequenz (siehe Tabelle 19). Bei den untersuchten CD3⁺ T-Zellen waren 10 von 12 Sequenzen unmutiert (siehe Abbildung 7). Allerdings zeigte hier eine Probe ein Wildtyp- zusammen mit einem mutierten Allel und eine weitere Probe nur das mutierte Allel (siehe Tabelle 19). Die Ausreißer in den MCL-Proben und in den CD3⁺ T-Zellen, stammen höchstwahrscheinlich von Kontamination während der Mikrodissektion.

Die vorgestellten Ergebnisse der *TP53*-Sequenzanalyse zeigen, dass das nicht-deletierte Allel von *TP53* im MCL somatisch mutiert ist und dass dieselbe Mutation in den HRS-Zellen vorliegt. Darüber hinaus weisen die HRS-Zellen neben der Deletion eines *TP53*-Allels ein weiteres unmutiertes Allel auf. Dies lässt vermuten, dass die Deletion des *TP53*-Allels, in beiden Lymphomen unabhängig voneinander stattgefunden haben muss.

3.3 Charakterisierung von humanen CD30⁺ B-Zellen

In lymphatischen Geweben, wie z.B. Lymphknoten und Tonsillen, ist CD30 auf einigen aktivierten B- und T-Zellen ausgeprägt, jedoch nicht auf B-Lymphozyten des peripheren Blutes. Dabei zeigen nur sehr wenige B-Zellen, die im GC und in extrafollikulären Regionen lokalisiert sind, eine Expression von CD30 (Stein *et al.*, 1985). Es handelt sich dabei um große, mononukleäre und proliferierende Zellen, über deren Herkunft, Eigenschaften und Differenzierungsstand nur sehr wenig bekannt ist. Da die HRS-Zellen des cHLs immer positiv für CD30 sind, war es interessant herauszufinden, ob es möglicherweise einen Zusammenhang zwischen den normalen CD30⁺ B-Zellen und den HRS-Zellen gibt. Um dem nachzugehen und die CD30⁺ B-Zellen im Allgemeinen besser zu charakterisieren, wurden von unserem ehemaligen Mitarbeiter Dr. Enrico Tiacci jeweils CD30⁺ GC- und CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen aus fünf Tonsillen durch Zellsortierung mit einem BD FACS-Diva isoliert und Genexpressionsprofile erstellt. Dabei wurden die Expressionsmuster beider CD30⁺ B-Zellpopulationen mit HRS-Zellen und weiteren B-Zellpopulationen verglichen. Der Vergleich zeigte in einem *Unsupervised Hierarchical Clustering*, dass sich die Proben der CD30⁺ B-Zellen deutlich in zwei eigenständige B-Zellpopulationen aber dennoch zusammen anordnen und sich in der Ausprägung ihrer Gene von gewöhnlichen GC-B-Zellen (Gesamt-GC-B-Zellen), naiven B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen unterscheiden. Darüber hinaus sind sie in ihrer Genexpression ähnlicher zu den HRS-Zellen, als alle analysierten CD30⁺ B-Zellpopulationen. Weiterführende bioinformatische Auswertungen der Genexpressionsprofile und ihre biologische Bedeutung wurden in unserer Arbeitsgruppe von Dr. Marc Weniger und Prof. Ralf Küppers in Zusammenarbeit mit der Bioinformatikerin Dr. Claudia Döring (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main) ausgewertet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten ergänzend zu den Genexpressionsdaten die CD30⁺ B-Zellen genauer mittels Durchflusszytometrie und IgV-Gen-PCR-Analysen charakterisiert werden und ein Teil der Genexpressionsprofile durch eine qRT-PCR von ausgewählten Genen und Western Blot-Analyse validiert werden.

3.3.1 Isolierung und Anreicherung von CD30⁺ B-Zellen aus Tonsillen

Für die phänotypische Charakterisierung und für die IgV-Genanalyse von CD30⁺ B-Zellen wurden zunächst mononukleäre Zellen aus tonsillärem Gewebe aufgereinigt und die seltenen CD30⁺ B-Zellen mittels CD30-MACS-Säulen isoliert und angereichert (siehe 2.2.1 und 2.2.2). Da aktivierte T-Zellen auch CD30 auf ihrer Oberfläche ausprägen, war es notwendig diese zuvor durch eine MACS-CD3-Depletion zu entfernen. Die Effizienz der CD3-Depletion und der CD30-Anreicherung wurde mit einer Doppel-Fluoreszenzfärbung überprüft. Vor und nach jedem MACS-Schritt wurden 0,5-1x10⁵ Zellen entnommen, mit anti-CD3- und anti-CD20-Antikörpern gefärbt und am BD FACS-Canto analysiert. Abbildung 8 zeigt exemplarisch die angefärbten Lymphozyten vor und nach der CD3-Depletion (A) und der CD30-Anreicherung (B).

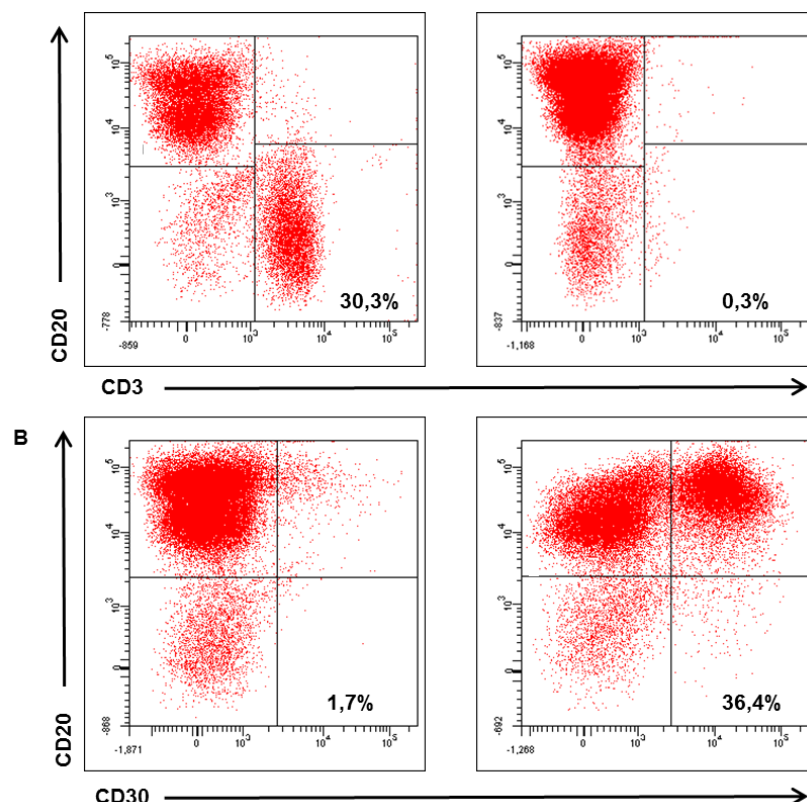


Abbildung 8: Überprüfung der CD3-Depletion und CD30-Anreicherung

Aus tonsillären Lymphozyten wurden die CD3⁺ T-Zellen mit MACS-Säulen depletiert sowie die CD30⁺ B-Zellen angereichert. Dargestellt ist eine typische FACS-Färbung gegen CD20 und CD3 bzw. CD30, die als Kontrolle der CD3-Depletion und CD30-Anreicherung durchgeführt wurde. A) Der Anteil der CD3⁺ T-Zellen wurde durch den CD3-MACS von 30,3% auf 0,3% reduziert. B) Die Population der CD30⁺ B-Zellen konnte von 1,7% auf 36,4% angereichert werden.

Der Anteil der $CD3^+CD20^-$ T-Zellen wurden durch die CD3-Depletion in der dargestellten Tonsille von 30,3% auf 0,3% reduziert. Durch die Anreicherung mit dem CD30-MACS konnten der Anteil der $CD30^+CD20^+$ B-Zellen von 1,7% auf 36,4% erhöht werden. Im Allgemeinen wurden nur Proben weiterverwendet bei denen der Anteil der T-Zellen auf mindestens 0,5% reduziert werden konnte. Der Anteil der $CD30^+$ B-Zellen aller weiterverwendeten Tonsillen konnte im Durchschnitt auf 22% angereichert werden.

Für die phänotypische Charakterisierung wurden die Zellen anschließend direkt mit den entsprechenden Antikörpern angefärbt und analysiert (siehe 3.3.2). Für die IgV-Gen-PCR-Analyse (3.3.3) wurden die angereicherten $CD30^+$ B-Zellen jedoch mit Antikörpern gegen CD20, CD38 und CD30 gefärbt und mit einem FACS-Diva Zellsortierer zu 2×1000 $CD30^+$ GC-B-Zellen und 2×1000 $CD30^+$ Nicht-GC-B-Zellen sortiert. Dazu wurden die B-Lymphozyten zunächst in GC-B-Zellen ($CD20^{++}CD38^+$) und in Nicht-GC-B-Zellen ($CD20^+CD38^{low}$) unterteilt (siehe Abbildung 9 links). Im Anschluss wurden von den Nicht-GC-B-Zellen (siehe Abbildung 9 Mitte) und von den GC-B-Zellen (siehe Abbildung 9 rechts) die $CD30^+$ Zellen von den $CD30^-$ Zellen getrennt. Aufgrund der geringen Anzahl und des teils schwachen CD30-Signals, besonders im Fall der $CD30^+$ Nicht-GC-B-Zellen, war es oft schwierig genügend Zellen und nicht verunreinigte Zellpopulationen zu sortieren.

Insgesamt wurden 9 Tonsillen für die IgV-Gen-PCR-Analyse wie oben beschrieben aufgearbeitet. Dabei konnte von drei Tonsillen nicht genügend $CD30^+$ B-Zellen sortiert werden, bei drei Tonsillen war zumindest eine der beiden Populationen verunreinigt und von den Zellen zweier Tonsillen brachte die IgV-Genanalyse keine auswertbaren Sequenzen hervor. Somit wurde die IgV-Genanalyse mit den $CD30^+$ B-Zellen einer Tonsille durchgeführt.

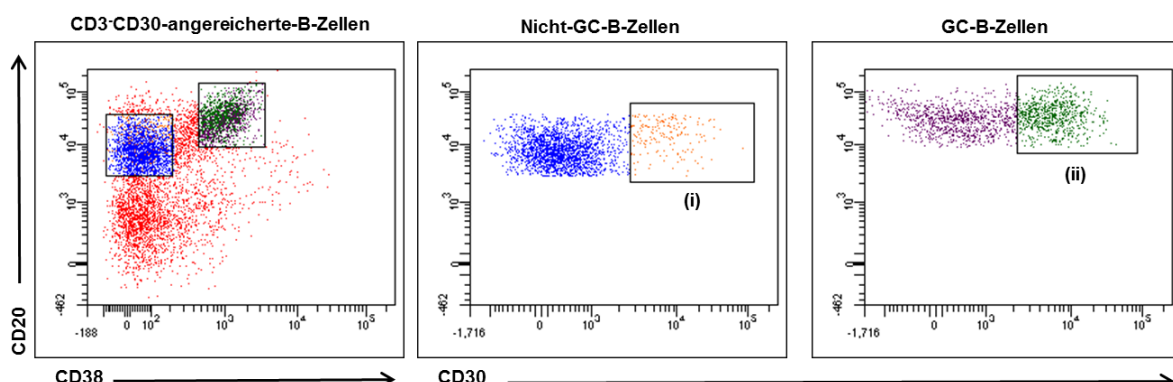


Abbildung 9: Sortierung von $CD30^+$ GC- und $CD30^+$ Nicht-GC-B-Zellen

Lymphozyten wurden aus Tonsillen isoliert, die $CD3^+$ T-Zellen mit MACS-Säulen entfernt und die $CD30^+$ B-Zellen angereichert. Die angereicherten $CD30^+$ B-Zellen wurden für CD20, CD38 und CD30 gefärbt und entsprechende Gates zur Unterscheidung von Nicht-GC-B-Zellen ($CD20^+CD38^{low}$) und GC-B-Zellen ($CD20^{++}CD38^+$) gesetzt. Aus diesen Populationen wurden anschließend durch weitere Gates die $CD30^+$ Nicht-GC-B-Zellen (i) und $CD30^+$ GC-B-Zellen (ii) voneinander getrennt und sortiert.

3.3.2 Phänotypische Charakterisierung von CD30⁺ B-Zellen

Für die phänotypische Charakterisierung der CD30⁺ B-Zellen wurde durchflusszytometrisch die Expression der BCR-Isotypen und des Oberflächenmarkers CD27 gemessen (Abbildung 10A). Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD20, CD38, CD30 und zusätzlich einem Antikörper, der gegen den jeweiligen BCR-Isotyp oder CD27 gerichtet war, gefärbt und die Expression gemessen. Die B-Zellen wurden zunächst in GC-B-Zellen (CD20⁺⁺CD38⁺) und in Nicht-GC-B-Zellen (CD20⁺CD38^{low}) unterteilt und die beiden Populationen weiter in CD30⁺ und CD30⁻ Zellen aufgetrennt. Anschließend wurden von den CD30⁺GC-B-Zellen, den CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen und den CD30⁻ GC-B-Zellen die Expression der verschiedenen Oberflächenmarker gemessen (siehe Abbildung 10A). Aufgrund der limitierten Zellzahlen der CD30⁺ Populationen konnten nicht alle Färbungen für jeden Spender durchgeführt werden. Für die unterschiedlichen Färbekombinationen wurden die Antikörper zunächst austitriert und an einigen Tonsillen ausgetestet. Anschließend wurden 15 Tonsillen aufgearbeitet und die verschiedenen Antikörperfärbungen durchgeführt. Aus verschiedenen Gründen wie z.B. dass die Färbung der Isotypkontrolle nicht funktioniert hat, die Auftrennung zwischen der CD30⁺- und CD30⁻-Population nicht ausreichend war oder die Tonsille zu wenig CD30⁺ Zellen aufwies, wurden am Ende die Expressionslevel verschiedener Marker von 10 Tonsillen ausgewertet und in Tabelle 20 zusammengefasst. Generell war die Verteilung der Isotypen auf CD30⁺ GC-B-Zellen sehr ähnlich zu der auf den CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen. So haben ungefähr 2/3 der analysierten CD30⁺ GC-B-Zellen und CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen einen Klassenwechsel vollzogen. Dabei prägen ca. je 50% der Zellen beider Populationen IgG und ca. je 20% IgA auf ihrer Oberfläche aus. Die Expression von IgE wurde in drei Spendern untersucht. Im Vergleich zur Isotypkontrolle konnte aber keine Expression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Größe der Populationen, die keinen Klassenwechsel vollzogen hatten und somit IgM auf ihrer Oberfläche ausprägten, betrug im Durchschnitt 9% bei den CD30⁺ GC-B-Zellen und 22% bei den CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen. Um die Populationen der Nicht-klassengewechselten Zellen genauer zu analysieren, wurde von vier Spendern eine zusätzliche Färbung durchgeführt (siehe Abbildung 10B). Die Zellproben wurden mit Antikörpern gegen CD30, CD38, IgM und IgD gefärbt. Es wurde auf die Färbung mit dem B-Zell-spezifischen CD20-Antikörper verzichtet, da durch die vorherige Depletion der T-Zellen, vorausgesetzt werden konnte, dass sich hauptsächlich B-Zellen in den Proben befanden. Somit konnten die CD30⁺ GC-B-Zellen (CD38⁺CD30⁺), die CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen (CD38⁻CD30⁺) und die CD30⁻ GC-B-Zellen (CD38⁺CD30⁻) voneinander getrennt werden und sich die Verteilung der Ausprägung von IgM und IgD von jeder Population genauer betrachten werden. Dabei wurde gezeigt, dass ein großer Anteil der IgM⁺ B-Zellen zusätzlich in geringer Menge IgD exprimiert, was typisch für aktivierte B-Zellen ist.

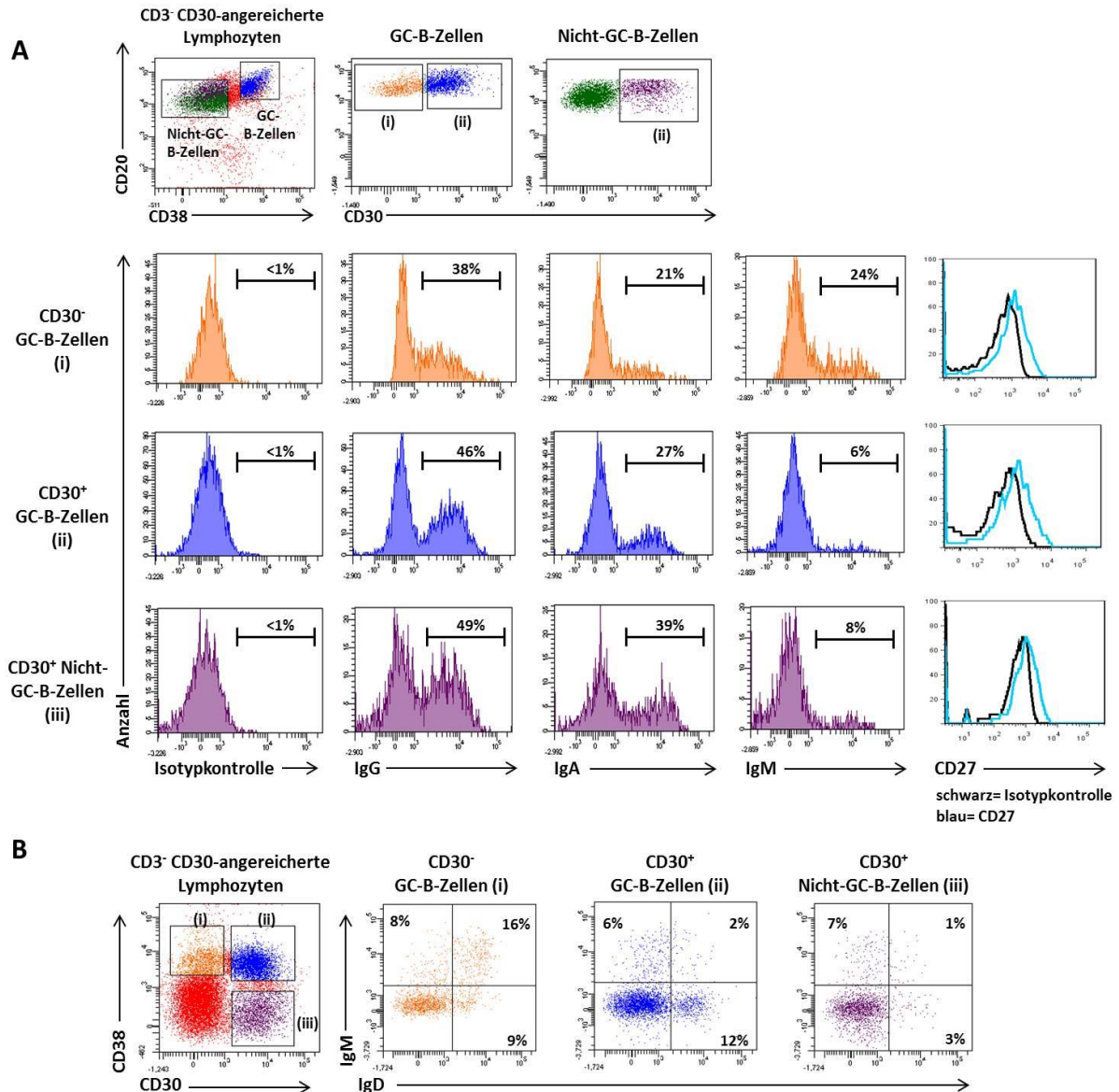


Abbildung 10: Repräsentative Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung von CD30⁺ B-Zellen

Lymphozyten wurden aus Tonsillen isoliert, und mit MACS-Säulen die CD3⁺ T-Zellen entfernt, sowie die CD30⁺ B-Zellen angereichert. A) Die angereicherten CD30⁺ B-Zellen wurden für CD20, CD38, CD30 und einem zusätzlichen Marker entweder IgG, IgA, IgM, IgE, CD27 oder eine Isotypkontrolle gefärbt. Es wurden entsprechende sogenannte *Gates* für die Unterscheidung von GC-B-Zellen (CD20⁺CD38⁺) und in Nicht-GC-B-Zellen (CD20⁺CD38^{low}) gesetzt und durch weitere *Gates* die jeweiligen CD30⁺ und CD30⁻ Populationen voneinander getrennt. Anschließend wurden für die CD30⁻ GC-B-Zellen (i), die CD30⁺ GC-B-Zellen (ii) und die CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen (iii) die Expressionslevel der unterschiedlichen Marker gemessen und der Anteil der positiven Zellen im Histogramm angegeben. Um zu verdeutlichen, dass die gesamte Population positiv für CD27 im Vergleich zur Isotypkontrolle war, wurden beide Histogramme übereinander gelegt. B) Um die Expression von IgD und IgM genauer zu analysieren wurden die Zellen für CD30, CD38, IgM und IgD gefärbt, entsprechende *Gates* für die Populationen CD30⁺ GC-B-Zellen, CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen und CD30⁻ GC-B-Zellen gesetzt und die Ausprägung von IgM und/oder IgD gemessen. Der Anteil der einzelnen Populationen ist in % in den jeweiligen Quadranten angegeben.

Tabelle 20: Phänotypische Charakterisierung von CD30⁺ B-Zellen

Zell- typ	Spen- der	IgM % ^a	IgM ⁺ IgD ^{low} % ^a	IgD-only %	IgG %	IgA %	IgG & IgA %	IgE % ^b	CD27 MFI ratio ^c
CD30 ⁺ GC-B- Zellen	1	n.a.	n.a.	n.a.	63	16	79	n.a.	1,9
	2	n.a.	n.a.	n.a.	61	21	82	n.a.	2,3
	3	5	n.a.	n.a.	59	3	62	n.a.	3,1
	4	19	n.a.	n.a.	43	27	70	n.a.	2,5
	5	9	n.a.	n.a.	48	35	83	n.a.	2,4
	6	4	n.a.	n.a.	66	4	70	n.a.	2,4
	7	4	3	2	39	48	87	0	3,7
	8	14	9	7	54	16	70	0	n.e.
	9	6	6	12	46	27	73	0	2,8
	10	10	7	10	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	2,4
	Mittel (Bereich)	9 (4-19)	6 (3-9)	8 (2-12)	53 (39-66)	22 (3-48)	75 (62-87)	0	2,6 (1,9- 3,7)
CD30 ⁺ Nicht- GC-B- Zellen	1	n.a.	n.a.	n.a.	46	19	65	n.a.	2,2
	2	n.a.	n.a.	n.a.	52	33	85	n.a.	3,4
	3	4	n.a.	n.a.	58	9	67	n.a.	5,7
	4	37	n.a.	n.a.	26	19	45	n.a.	3,3
	5	21	n.a.	n.a.	42	23	65	n.a.	2,8
	6	9	n.a.	n.a.	69	6	75	n.a.	9,6
	7	8	5	2	50	38	88	0	21
	8	54	43	19	17	9	26	0	n.e.
	9	8	7	3	49	39	88	0	9,9
	10	36	29	25	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	2,5
	Mittel (Bereich)	22 (4-54)	21 (5-43)	12 (2-25)	45 (17-69)	22 (6-39)	67 (26-88)	0	6,7 (2,2-21)
CD30 ⁻ GC-B- Zellen	1	n.a.	n.a.	n.a.	59	20	79	n.a.	2,4
	2	n.a.	n.a.	n.a.	52	24	76	n.a.	2,9
	3	16	n.a.	n.a.	49	0	49	n.a.	2,2
	4	33	n.a.	n.a.	41	15	56	n.a.	2,8
	5	18	n.a.	n.a.	54	19	73	n.a.	2,2
	6	8	n.a.	n.a.	51	2	53	n.a.	2,0
	7	9	4	19	36	43	79	0	3,1
	8	19	12	3	56	13	69	0	n.e.
	9	24	8	9	38	21	59	0	2,4
	10	25	12	14	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	2,3
	Mittel (Bereich)	19 (8-33)	9 (4-12)	11 (3-19)	48 (36-59)	17 (0-43)	66 (49-79)	0	2,5 (2,0- 3,1)

^aFür Spender 3-6 wurden die IgM⁺ B-Zellen durch eine Antikörperfärbung gegen CD20, CD30, CD38 und IgM ermittelt; Für Spender 7-10 erfolgte eine Färbung der isolierten B-Zellen gegen CD30, CD38, IgM und IgD, so dass IgM⁺IgD^{low} und IgD-only B-Zellen analysiert werden konnten.

^bIm Vergleich zu Isotypkontrolle war das Expressionslevel kaum höher

^cIm Vergleich zur Isotypkontrolle war die gesamte Population positiv (nach rechts verschoben); zur besseren Veranschaulichung wurde die MFI ratio ermittelt.

n.a., nicht analysiert; n.e., nicht auswertbar; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich unter den CD30⁺ GC-B-Zellen zwischen 2-12% und unter den CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen zwischen 2-25% IgD-only (IgD⁺IgM⁻) B-Zellen, befinden. IgD-only B-Zellen sind eine kleine Population von Gedächtnis-B-Zellen, die eine enorm hohe Mutationsfrequenz ihrer IgV-Gene und eine Deletion des Cμ-Gensegmentes aufgrund eines ungewöhnlichen Klassenwechsels, aufweisen (Liu et al., 1996). Es ist bekannt, dass die Expression von CD27 charakteristisch für Gedächtnis-B-Zellen ist und ein genereller Marker für somatisch mutierte IgV-Gene in

B-Zellen darstellt. CD27 ist aber auch in GC-B-Zellen hochreguliert und stark auf Plasmazellen ausgeprägt (Klein et al., 1998). Bei der Färbung der drei B-Zellpopulationen für CD27 ist im Vergleich zur Isotypkontrolle eine leichte rechts Verschiebung der jeweils gesamten Population zu erkennen. Somit scheinen fast alle Zellen positiv für CD27 zu sein, im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Färbungen, in denen immer nur ein Teil der Population positiv war. Um dies besser zu veranschaulichen wurde für CD27 und die entsprechende Isotypkontrolle die MFI ratio (Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität, engl. mean fluorescence intensity ratio) bestimmt (siehe Tabelle 20) und beide Histogramme übereinander gelegt dargestellt (siehe Abbildung 10A). Zusätzlich zeigte die Analyse der Expression des Oberflächenmarkers CD27, dass beide CD30⁺ B-Zellpopulationen ähnlich viel CD27 ausprägen wie gewöhnliche CD30⁻ GC-B-Zellen, wobei die Expression von CD27 in den CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen leicht höher erscheint. Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse dieser Analyse, dass die CD30⁺ GC-B-Zellen phänotypisch stark gewöhnlichen GC-B-Zellen ähneln und dass die CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen durch ihre Expression von CD27 und dem hohen Anteil klassengewechselter Zellen wahrscheinlich eine Art Post-GC-Gedächtnis-B-Zellen darstellen.

3.3.3 IgV-Genanalyse der CD30⁺ B-Zellen

Mit Hilfe der IgV-Genanalyse sollten die CD30⁺ GC- und CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen genauer charakterisiert werden. Die Analyse sollte unter anderem Aufschluss über das IgV-Gen-Mutationsmuster und die Mutationsfrequenz beider Populationen geben und zeigen, ob die CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen überhaupt Mutationen in ihren IgV-Genen aufweisen. Zusätzlich wurde nach expandierten Klonen, innerhalb und zwischen beiden CD30⁺ Populationen, gesucht um den Verwandtschaftsgrad festzustellen. Außerdem wurde das Selektionsmuster der Zellpopulationen genauer betrachtet und nach verkrüppelnden Mutationen in den Sequenzen gesucht, die auf eine Ähnlichkeit der Zellen zu den HRS-Zellen des cHL hinweisen könnten, da in 25% aller cHL-Fälle verkrüppelnde Mutationen in den IgV-Genumlagerungen nachgewiesen wurden.

Dazu wurden 2x 1000 CD30⁺ GC-B-Zellen und 2x 1000 CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen sortiert und die IgV-Genumlagerungen der größten VH-Genfamilien (VH1, 3 und 4) mittels *seminested* IgV-Gen PCR amplifiziert. Als Positivkontrolle wurden für jede IgV-Genfamilie Ansätze mit genomischer DNA von lymphoblastoiden Zelllinien, deren V-Genumlagerungen bekannt waren, mitgeführt. Im Falle von negativen Positivkontrollen wurde die PCR wiederholt. Zusätzlich dienten zellfreie Reaktionsansätze als Negativkontrolle. Aufgrund von Kontaminationen in den Negativkontrollen musste zunächst die PCR mehrmals unter hohen Hygienestandards und Austausch der Reagenzien wiederholt werden, bis alle Negativkontrollen kontaminationsfrei blieben. Die Quelle der Kontamination konnte nicht eindeutig zugeordnet werden. Im Anschluss daran wurden die PCR-Produkte kloniert und

43 Sequenzen pro Population ermittelt von denen 39 bzw. 40 analysiert werden konnten. Bei der Analyse der Sequenzen wurden die IgV-Genumlagerungen identifiziert, überprüft, ob die Sequenz produktiv ist (d.h. sich die CDR3 im Leseraster befindet, kein vorzeitiges Stopcodon generiert wurde und kein VH-Pseudogen verwendet wurde), die Mutationsfrequenz berechnet, das R/S-Verhältnis der FR ermittelt (Verhältnis aus Mutationen mit Aminosäureaustausch R zu stillen Mutationen S) und Besonderheiten wie verkrüppelnde Mutationen oder das Auftreten von Klonen untersucht.

Ergänzend standen für die Charakterisierung der CD30⁺ GC- und CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen für jede Population Sequenzen von drei weiteren Tonsillen zur Verfügung, die im Vorfeld von Dr. Enrico Tiacchi erstellt worden sind. Aufgrund eines etwas anderem Vorgehen in der Analyse der Sequenzen z.B. bei der Bestimmungen der Mutationsfrequenz und des R/S-Verhältnisses, wurden die 74 Sequenzen der CD30⁺ GC-B-Zellen und die 59 Sequenzen der CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen als Bestandteil dieser Arbeit neu ausgewertet, so dass die Ergebnisse aller Sequenzen miteinander vergleichbar waren. Die Ergebnisse der Sequenzanalysen sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Die Mutationsfrequenzen der umgelagerten IgV-Gene wurden berechnet, indem die Anzahl der somatischen Mutationen bis zum Beginn der CDR3 durch die Gesamtanzahl der Nukleotide bis zum Beginn der CDR3 dividiert wurde. Zusätzlich wurden auch die Mutationen berücksichtigt, die schon in der CDR3 lokalisiert waren, so lange noch mindestens zwei unmutierte Nukleotide folgten, um auszuschließen, dass es sich dabei um N-Nukleotide handelte, die während der IgV-Genumlagerung eingefügt wurden. Bei der Ermittlung der Mutationsfrequenz wurden nur mutierte Sequenzen berücksichtigt. Wenn die Sequenzen jedoch nur eine einzige Mutation aufwiesen, wurden sie bei der Berechnung nicht berücksichtigt, da ein Polymerasefehler nicht ausgeschlossen werden konnte. Das Auftreten von Deletionen oder Insertionen wurde als eine Mutation gewertet, auch wenn dadurch mehrere Nukleotide eingefügt oder entfernt wurden. Es wurden sowohl Sequenzen deren IgV-Genumlagerungen sich im Leseraster als auch diejenigen die sich nicht im Leseraster befanden berücksichtigt. Außerdem wurden identische Sequenzen nur einmal gezählt, da Sie von einer Zelle abstammen könnten. Im Fall von intraklonaler Diversität wurde jede einzelne Sequenz mitgezählt. Die Ergebnisse zeigen, dass mit einer Ausnahme, alle 114 ausgewerteten Sequenzen der CD30⁺ GC-B-Zellen somatisch mutiert sind und die mittlere Mutationsfrequenz der IgV-Genumlagerungen der einzelnen Tonsillen zwischen 4,6% und 8% lag. Im Vergleich zu gewöhnlichen GC-B-Zellen, die eine durchschnittliche Mutationsfrequenz von 5-6% aufweisen, ist die Mutationsfrequenz der CD30⁺ GC-B-Zellen, ein wenig höher (Klein *et al.*, 1998a). Die IgV-Genumlagerungen der CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen waren in drei von vier untersuchten Tonsillen ebenfalls zu 79 bis 92% mutiert. Nur in einem Spender waren 67% der Zellen unmutiert. Die mittlere

Mutationsfrequenz der CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen betrug in den Sequenzen der vier Spendern zwischen 2,9% und 8,2%, was ungefähr im Bereich für Post-GC-B-Zellen liegt. Die R/S-Werte der FR vermitteln einen Anhaltspunkt für die Stärke der Selektion zur Expression eines funktionellen BCRs. Je mehr Aminosäureaustauschmutationen vorhanden sind bzw. je höher der Quotient, desto schlechter ist der BCR selektioniert. Bei der Berechnung wurden nur IgV-Genumlagerungen berücksichtigt die sich im Leseraster befanden. Für jede Sequenz wurden die Aminosäureaustauschmutationen sowie die stillen Mutationen separat addiert, und aus den Summen der Quotient gebildet. Dabei wurden alle Aminosäureaustauschmutationen separat gezählt, auch wenn sie zum Austausch eines gleichen Codons führten. Die R/S-Werte der FR in den CD30⁺ GC-B-Zellen der einzelnen Spender lagen bis auf eine Ausnahme bei einem Mittelwert von 1,4-1,9, der typisch ist für selektionierte GC-B-Zellen (Klein *et al.*, 1998a). Eine Ausnahme stellten die Zellen der Tonsille 3 dar, deren durchschnittlicher R/S-Wert mit 2,4 leicht höher gewesen ist. Die R/S-Werte der CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen waren mit 1,3-1,8 etwas niedriger und lagen in einem Bereich der typisch ist für gut selektionierte Post-GC-B-Zellen. Verkrüppelnde Mutationen, die dazu führen, dass eine ursprünglich funktionelle IgV-Genumlagerung nicht mehr funktionell ist, wurden nur selten gefunden. Von zwei Spendern (1 und 2) wurde jeweils eine verkrüppelnde Mutation in den CD30⁺ GC-B-Zellen und in Spender 6 wurde eine in den CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen nachgewiesen. Allerdings konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der verkrüppelnden Mutation der CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen um einen Polymerasefehler handelt da es die einzige Mutation in der gesamten Sequenz war.

Des Weiteren zeigten die Analysen in einem kleinen Teil der CD30⁺ B-Zellen intraklonale Diversität. So wurden unter den CD30⁺ GC-B-Zellen in drei von vier Spendern ein bis vier Klone mit zwei bis drei Klonmitgliedern identifiziert, die Mitglieder von größeren Klonen darstellen könnten. In Tonsille 1 könnten noch zwei weitere Klone mit jeweils zwei Zellen enthalten sein, die jedoch nur eine einzige individuelle Mutation aufwiesen, wodurch ein Polymerasefehler nicht ausgeschlossen werden konnte. Aus diesem Grund wurden diese Sequenzen nicht als eigener Klon bewertet. Für den gefundenen Klon von Spender 3 wurde zusätzlich ein Klonmitglied unter den CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen gefunden. Unter den CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen wurden wiederum für einen weiteren Spender (4) zwei Klone mit jeweils zwei Klonmitgliedern aufgezeigt.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse der IgV-Genanalyse, dass die CD30⁺ GC-B-Zellen sehr stark den gewöhnlichen GC-B-Zellen ähneln. Im Gegensatz dazu scheint sich ein großer Teil der CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen in einem Post-GC-B-Stadium zu befinden und Gedächtnis-B-Zellen zu repräsentieren, was durch die mutierten und gut selektionierten IgV-Genumlagerungen angedeutet wird. Bei dem unmutierten Anteil der CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen handelt es sich wahrscheinlich um B-Zellen, die noch nicht an der GC-Reaktion

teilgenommen haben bzw. die das GC wieder verlassen haben bevor die SHM stattgefunden hat. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die unmutierten CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen aktivierte naive B-Zellen einer T-Zell-unabhängigen Immunreaktion darstellen. In beiden B-Zellpopulationen wurde in geringem Ausmaß intraklonale Diversität nachgewiesen.

Tabelle 21: IgV-Gen-Mutationsanalyse von CD30⁺ GC- und CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen

Zelltyp/ Tonsille	VH-Gen- Familie	Mutierte Sequenzen/ alle Sequenzen (%)	Mittlere Mutations- frequenz % (Bereich)	R/S ratio in FR1-3	verkrü- pelte Sequenzen	Anzahl Klone	Zellen pro Klon
CD30 ⁺ GC-B-Zellen							
1	3	23/23 (100)	5,6 (0,7-11,8)	1,7	1/23	4	2-3
2	3	23/23 (100)	8 (3,4-14,2)	1,9	1/23	0	0
3	3	28/28 (100)	4,6 (1,4-9,8)	2,4	0/28	2	2 und 3 (+1 CD30 ⁺ Nicht-GC-B- Zellen) ^a
4	1, 3, 4	39/40 (98)	4,9 (0,7-17)	1,4	0/40	1	2
CD30 ⁺ Nicht-GC-B-Zellen							
3	3	15/19 (79)	4,3 (1,0-9,2)	1,7	0/16	1	1 (+3 CD30 ⁺ GC- B- Zellen) ^a
4	1, 3, 4	36/39 (92)	5,2 (0,7-12,9)	1,4	0/39	2	2
5	3	18/22 (82)	8,2 (1,7-20,3)	1,3	0/18	0	0
6	3	6/18 (33)	2,9 (0,7-9,3)	1,8	1/11	0	0

^aEin Klon von Tonsille 3 umfasst drei Zellen innerhalb der CD30⁺ GC-B-Zellen und eine Zelle innerhalb der CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen.

3.3.4 Validierung der Genexpressionsprofile durch qRT-PCR und

Western Blot

Im Rahmen der bioinformatischen Auswertungen der generierten Genexpressionsprofilen der CD30⁺ B-Zellen und verschiedener B-Zellpopulationen sind ausgewählte Vergleiche der Genexpression zwischen beiden CD30⁺ B-Zellpopulationen, zwischen CD30⁺ GC-B-Zellen und CD30⁻ GC-B-Zellen, zwischen CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen, sowie zwischen CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen und Plasmazellen durchgeführt worden, um Gene zu identifizieren und auszuwählen, die in den einzelnen Populationen unterschiedlich stark ausgeprägt werden. Diese Unterschiede sollten durch qRT-PCR- und Western Blot-Analysen mit sortierten Zellen validiert werden. Zu den ausgewählten Genen gehörte *EBI2* (*Epstein-Barr virus-induced G-protein coupled receptor 2*), das in den CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen 3-fach höher exprimiert war als in den CD30⁺ GC-B-Zellen. *EBI2* ist auch bekannt als

G-Protein-gekoppelter Rezeptor 183 (*GPR183*). *EBI2* wird in Folge der B-Zell-Aktivierung durch BCR- oder CD40-Stimulation hochreguliert und während der GC-Reaktion wieder herunterreguliert. Zum Verlassen des GC und zum Wiedereintritt in die äußere Follikelzone, wird *EBI2* wiederum hochreguliert. Somit stellt *EBI2* einen wichtigen Faktor für die Bewegung und Lokalisierung der B-Zellen zwischen GC und äußerer Follikelzone dar (Pereira *et al.*, 2009). Auch *PRDM1* (*PR domain zinc finger protein 1*) zeigte eine erhöhte Expression in den CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen im Vergleich zu den CD30⁺ GC-B-Zellen. *PRDM1* ist auch bekannt als *BLIMP1* und ein entscheidender Faktor für die Differenzierung von GC-B-Zellen in Plasmazellen (Shaffer *et al.*, 2002), was die Hochregulierung von *PRDM1* in den Plasmazellen erklärt. Des Weiteren wurden die B-Zell-Differenzierungsmarker *FOXP1* (*forkhead box P1*) und *BACH2* (*BTB and CNC homolog 2*) ausgewählt, deren Expression in den gewöhnlichen GC-B-Zellen 4-fach höher reguliert war als in den CD30⁺ GC-B-Zellen. *FOXP1* ist ein wichtiger Marker in der frühen B-Zell-Entwicklung und *BACH2* ein entscheidender Faktor für die Unterdrückung der Plasmazell-Differenzierung und begünstigt gleichzeitig den Prozess des Klassenwechsels im GC (Shaffer *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu war *MYC* und *CCL22* (*chemokine (C-C motif) ligand 22*) in den CD30⁺ GC-B-Zellen hochreguliert. Darüber hinaus zeigte *CCL22* eine erhöhte Expression in den CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen im Vergleich zu Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen. *MYC* ist ein Proliferationsmarker und wird im GC für die Rezirkulation der positiv selektierten GC-B-Zellen zwischen heller und dunkler Zone, mit anschließender Durchführung einer neuen Runde von Proliferation, SHM und Affinitätsselektion benötigt (De Silva & Klein, 2015). *CCL22* ist auch bekannt als *Macrophage-derived chemokine* (MDC), und kann neben Makrophagen und dendritischen Zellen unter anderem auch von CD40- und IL-4 stimulierten B-Zellen produziert werden (Lin *et al.*, 2003). *CCL22* bindet an den Chemokinrezeptor CCR4 welcher von TH2-Zellen und regulatorischen T-Zellen exprimiert wird und spielt somit eine Rolle bei der Interaktion zwischen B- und T-Zellen (Imai *et al.*, 1999; Iellem *et al.*, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die unterschiedlichen CD30⁺ und CD30⁻ B-Zellpopulationen aus sechs verschiedenen Tonsillen sortiert. Nach erfolgreicher RNA-Isolierung und cDNA-Synthese folgte die Messung des mRNA-Expressionlevels der ausgewählten Gene durch qRT-PCR. Dabei enthielten die Ansätze cDNA entsprechend der Menge von 500 Zellen und es wurden Triplikate gemessen. Von den drei Ansätzen wurde der Mittelwert bestimmt. Die erhaltenen Ct-Werte wurden direkt miteinander verglichen, da eine Normalisierung zu typischen Referenzgenen wie. z.B. GAPDH oder TBP nicht angewendet werden konnte, weil diese Gene unterschiedliche Expressionslevel im Vergleich der CD30⁺ B-Zellen zu den CD30⁻ B-Zellen zeigten. Das kann wahrscheinlich dadurch erklärt werden, dass die *MYC*-Expression in den CD30⁺ B-Zellen einen starken Einfluss auf die allgemeine mRNA-Expression dieser Zellen hat (Lin *et al.*, 2012; Nie *et al.*, 2012). Um

dennoch eine Form der Normalisierung zu erreichen wurde sorgfältig darauf geachtet, dass von den unterschiedlichen Populationen gleiche Zellzahlen eingesetzt wurden. Da manche der Gene in einigen B-Zellpopulationen nicht oder nur kaum exprimiert wurden und der entsprechende Ct-Wert vom Analysegerät als „*Undetermined*“ bezeichnet wurde, wurde für diese Fälle der letzte gemessene Zyklus (40) als hypothetischer C_t -Wert angenommen (z.B. *CCL22* in den Plasmazellen). Dadurch wurde die Hochregulation von einigen Genen theoretisch unterschätzt.

Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigten eine signifikante Hochregulierung für *PRDM1* in den $CD30^+$ Nicht-GC-B-Zellen im Vergleich zu den $CD30^+$ GC-B-Zellen (siehe Abbildung 11), was die Analyse der Genexpressionsprofile bestätigt. Es wurde außerdem erwartet, dass die Plasmazellen von allen analysierten Zellproben am höchsten *PRDM1* exprimieren, was die vorliegenden Daten sehr schön darstellen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass *BACH2* signifikant höher in den $CD30^-$ GC-B-Zellen im Vergleich zu den $CD30^+$ GC-B-Zellen, und *MYC* stärker in den $CD30^+$ GC-B-Zellen verglichen mit den $CD30^-$ GC-B-Zellen ausgeprägt ist (siehe Abbildung 11). Auch die ermittelten Daten für *CCL22* stimmen mit den Ergebnissen der Genexpressionsprofile überein. So konnte signifikant mehr *CCL22* in den $CD30^+$ GC-B-Zellen als in den $CD30^-$ GC-B-Zellen gemessen werden und auch die $CD30^+$ Nicht-GC-B-Zellen zeigen eine stärkere Ausprägung von *CCL22* im Vergleich zu Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen (siehe Abbildung 11). Die 3-fach höhere Ausprägung von *EBI2* in den $CD30^+$ Nicht-GC-B-Zellen im Vergleich zu den $CD30^+$ GC-B-Zellen, konnte mittels qRT-PCR nicht bestätigt werden. *FOXP1* zeigte in den bioinformatischen Auswertungen der Genexpressionsprofile eine 4-fach höhere Ausprägung in den $CD30^-$ GC-B-Zellen im Vergleich zu den $CD30^+$ GC B-Zellen. Anhand der ermittelten Ct-Werte konnte mittels qRT-PCR eine 3,5 fache höher Regulierung gemessen werden, die aber nicht signifikant (p -Wert = 0,052) war. Im Allgemeinen bestätigen die Ergebnisse der qRT-PCR die Resultate der Genexpressionsprofile, vor allem für die Gene *PRDM1*, *BACH2*, *MYC* und *CCL22*.

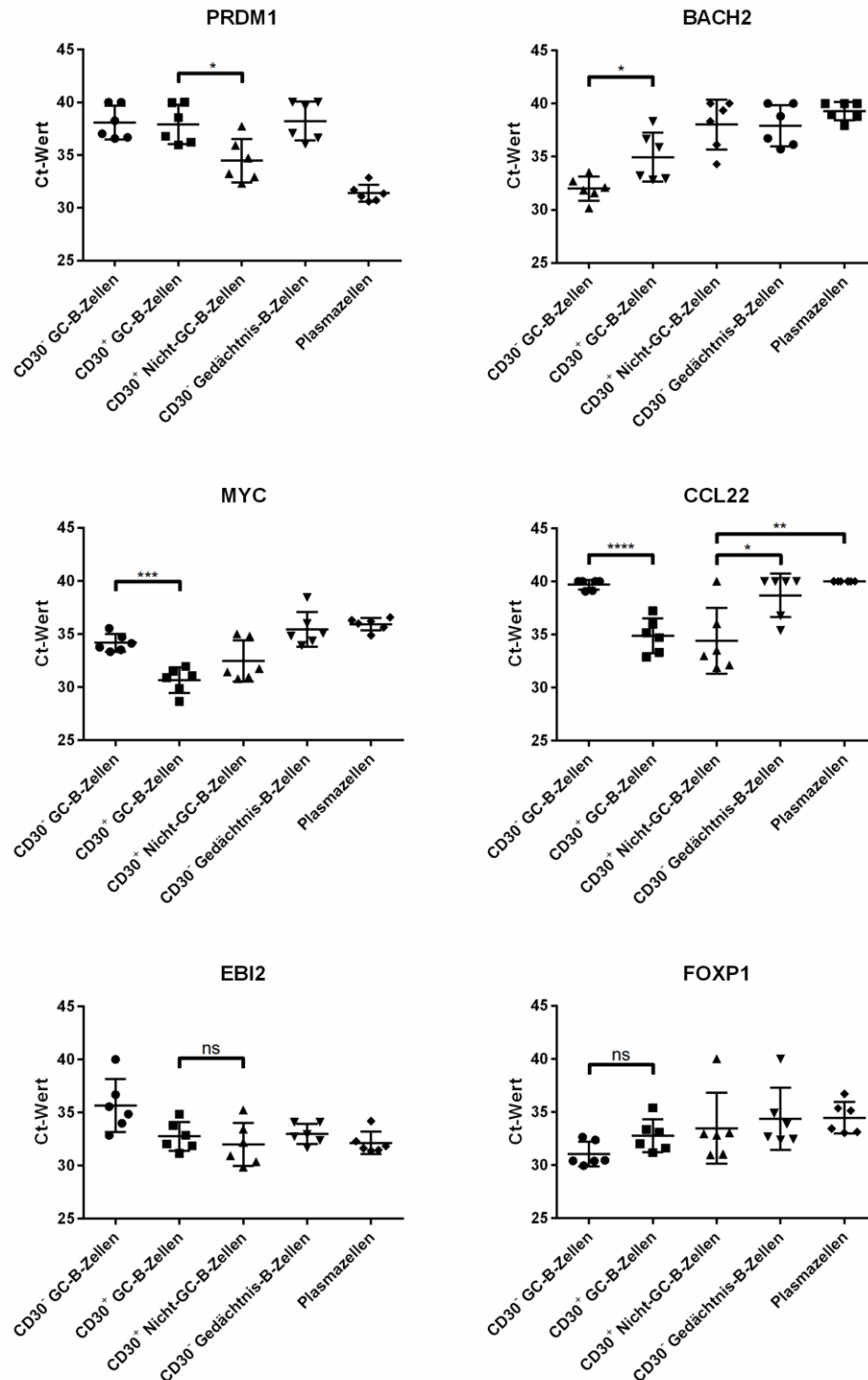


Abbildung 11: Vergleich der Genexpression verschiedener Gene in unterschiedlichen CD30⁺ und CD30⁻ B-Zellpopulationen

Unterschiedliche CD30⁺ und CD30⁻ B-Zellpopulationen wurden aus sechs Tonsillen mittels MACS-Säulen und FACS isoliert und anschließend die mRNA-Expression verschiedener Gene in den unterschiedlichen B-Zellpopulationen durch qRT-PCR bestimmt.

Für jedes Gen ist der Mittelwert von drei Ct-Werten pro Tonsille und B-Zellpopulation abgebildet. Dargestellt sind zusätzlich die Mittelwerte mit Standardabweichung je B-Zellpopulation. Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde durch einen ungepaarten zweiseitigen T-Test durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zellpopulationen sind dargestellt durch * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001, ns = nicht signifikant. Der p-Wert für FOXP1 zwischen den CD30⁻ GC-B-Zellen und den CD30⁺ GC-B-Zellen beträgt 0,0523 und ist somit nur knapp nicht signifikant. Der Vergleich der Ct-Werte zeigt in diesem Fall eine 3,5-fache höhere Ausprägung in den CD30⁻ GC-B-Zellen.

Um die in den Genexpressionsdaten und qRT-PCRs identifizierte erhöhte Expression von MYC in den CD30⁺ GC-B-Zellen im Vergleich zu den herkömmlichen GC-B-Zellen auf Proteinebene zu bestätigen, wurde ein Western Blot durchgeführt. Dazu wurde je Zellpopulation die Proteinmenge von $2,5 \times 10^5$ sortierten Zellen eingesetzt. Zu den Proben der CD30⁻ GC-B-Zellen, CD30⁻ Gedächtnis-B-Zellen und CD30⁺ B-Zellen (GC- und Nicht-GC-B-Zellen) wurde als Positivkontrolle die cHL-Zelllinie L-428 mit analysiert. Zusätzlich zu MYC wurde das Referenzgen VCP analysiert.

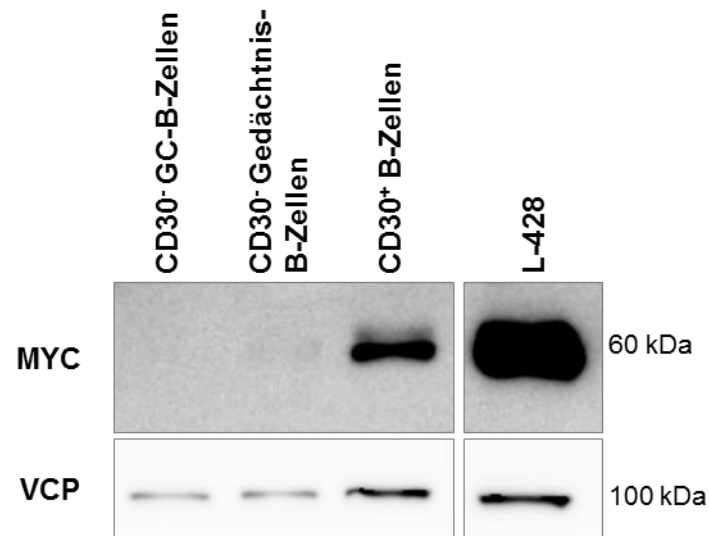


Abbildung 12: MYC-Expression in CD30⁺ B-Zellen

CD30⁻ GC- und Gedächtnis-B-Zellen, sowie CD30⁺ B-Zellen wurden aus tonsillärem Gewebe isoliert und deren MYC-Proteinexpression mittels Western Blot analysiert. Die CD30⁺ B-Zellen, sowie die cHL-Zelllinie L-428 zeigen eine deutliche Proteinexpression von MYC. Im Gegensatz dazu ist in den CD30⁻ GC-B-Zellen und in den CD30⁻ Gedächtnis-B-Zellen keine Expression von MYC nachweisbar.

Das Ergebnis der Western Blot-Analyse zeigt eine deutliche MYC-Proteinexpression der CD30⁺ B-Zellen im Vergleich zu den beiden anderen B-Zellpopulationen und korreliert folglich sehr gut mit der erhöhten mRNA-Ausprägung der Genexpressionsdaten und den Ergebnissen der qRT-PCRs (siehe Abbildung 12). Analog zu den qRT-PCR-Analysen zeigten die MYC-positiven Zellen eine erhöhte Expression des Referenzgens VCP bei gleicher eingesetzter Zellmenge. Die stärkere Proteinexpression von VCP in den CD30⁺ B-Zellen im Vergleich zu den CD30⁻ B-Zellen wird wahrscheinlich durch MYC induziert (Lin et al., 2012; Nie et al., 2012).

4 Diskussion

4.1 Suche nach **CD58**-Mutationen in den HRS-Zellen des cHL

CD58 ist ein Adhäsionsmolekül, das auf einer Vielzahl hämatopoetischer Zellen, aber auch auf malignen Zellen, wie z.B. den HRS-Zellen des cHL, ausgeprägt wird. Auf den HRS-Zellen ist es unter anderem bedeutend für die Bindung rosettierender T-Zellen (Sanders *et al.*, 1988; Fromm *et al.*, 2006). Erst kürzlich wurde die Inaktivierung von CD58 als Strategie der Immunevasion in Zellen des DLBCLs und einiger T-Zell-Lymphome beschrieben (Challa-Malladi *et al.*, 2011; Palomero *et al.*, 2014). Es wurde gezeigt, dass der Verlust von CD58 dazu beiträgt, dass die Zellen schlechter von NK-Zellen erkannt werden und somit die Zytolyse durch NK-Zellen vermindert ist (Challa-Malladi *et al.*, 2011).

Auch die HRS-Zellen des cHL haben verschiedene Mechanismen entwickelt ihr Mikromilieu so zu manipulieren, dass sie Angriffe des Immunsystems ausweichen können. Durch die Ausschüttung von Chemokinen werden regulatorische T-Zellen von den HRS-Zellen angelockt, die zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen durch die Freisetzung von immunsupprimierenden Faktoren, wie z.B. IL-10 und TGF- β , inhibieren (Kadin *et al.*, 1990; Herbst *et al.*, 1996; Skinnider & Mak, 2002). Auch der Verlust von MHC-I-Molekülen durch inaktivierende Mutationen des B2M-Gens wurde kürzlich als Mechanismus der Immunevasion von HRS-Zellen beschrieben (Reichel *et al.*, 2015). Eine weitere Strategie der HRS-Zellen ist die Ausprägung von CD95- und PD1-Liganden, die in den zytotoxischen T-Zellen Apoptose einleiten oder deren Aktivität hemmen (Verbeke *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2008). Diese und weitere Mechanismen verdeutlichen die bedeutende Rolle der Immunevasion in der Pathogenese des cHL (Steidl *et al.*, 2011) und lassen vermuten, dass noch weitere Faktoren daran beteiligt sind.

4.1.1 Analyse von **CD58** in HL-Zelllinien

In früheren Studien wurden für das Gen CD58 mittels Microarray-basierten komparativen genomische Hybridisierungen (Array-CGH) mit vier cHL-Zelllinien eine homozygote Deletion in der KM-H2 und mittels Exom-Sequenzierung von sieben cHL-Zelllinien Mutationen in zwei der HL-Zelllinien (KM-H2 und DEV) identifiziert (Giefing *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2014). Im Rahmen eines Kooperationsprojektes identifizierten unsere Kollegen in Kiel in drei von sieben analysierten cHL-Zelllinien Mutationen im CD58-Gen, die anschließend von Ihnen validiert und spezifiziert wurden. Dabei handelte es sich um homozygote Deletionen von Exon 1-3 in der Zelllinie SUP-HD1, von Exon 2 und Teilen von Intron 2 in der Zelllinie U-HO1 und einer Deletion, die zu einer 5' Spleiß-Mutation von Intron 3 führt, in der Zelllinie KM-H2. Im Gegensatz dazu wurde in der Arbeit von Liu und Kollegen die in diesem Projekt identifizierte homozygote Deletion in der Zelllinie SUP-HD1 nicht entdeckt und die Zelllinie

U-HO1 wurde in deren Analyse nicht einbezogen (Liu *et al.*, 2014). Zu den sieben in Kiel analysierten Zelllinien gehörten unter andern auch die *CD58*-unmutierten cHL-Zelllinien L1236 und L428, für die auch in einer kürzlich erschienenen Studie mit Exom-Sequenzierung keine Mutationen identifiziert werden konnten (Reichel *et al.*, 2015). Die als Bestandteil dieser Arbeit durchgeführten Mutationsanalysen von *CD58* in den cHL-Zelllinien SUP-HD1, U-HO1 und KM-H2 bestätigten die gefundenen Deletionen unserer Kooperationspartner in Kiel. Anschließend wurden die cHL-Zelllinien einschließlich der L-1236, die unmutiert für *CD58* ist, für Analysen zur Proteinexpression von *CD58* verwendet. Durch Oberflächenfärbungen von *CD58* konnte gezeigt werden, dass die gefundenen Deletionen in den cHL-Zelllinien SUP-HD1, U-HO1 und KM-H2 zu einem Verlust der Proteinausprägung von *CD58* führen und ergänzend somit gut die Ergebnisse der RNA-Analysen unserer Kooperationspartner in Kiel. Im Gegensatz dazu exprimierte die cHL-Zelllinie L-1236 *CD58*-Protein auf ihrer Oberfläche, wie es in einer vorherigen Studie bereits gezeigt wurde (Fromm *et al.*, 2006).

4.1.2 Mutationsanalyse von *CD58* in primären cHL-Fällen

Der Befund von destruktiven Deletionen im *CD58*-Gen der HL-Zelllinien SUP-HD1, U-HO1 und KM-H2 ließ vermuten, dass auch in primären Fällen des cHLs genetische Läsionen dieses Gens auftreten. Deshalb wurde eine Mutationsanalyse von *CD58* in 10 primären cHL-Fällen durchgeführt, jedoch konnten im Gegensatz zu den cHL-Zelllinien keine Mutationen gefunden werden. Die zuerst identifizierten Einzel-Nukleotidaustauschmutationen in den WGA-Proben, konnten mit analysierten Zweizellproben nicht bestätigt werden. Ursprünglich sollte die WGA eingesetzt werden, um Mutationsanalysen der HRS-Zellen zu erleichtern. Die Idee war, dass man die im Tumorgewebe nur selten vorkommenden HRS-Zellen einmal mittels Mikrodissektion isoliert und durch Verwendung der WGA deren DNA vervielfältigt, um so genug Material für die Mutationsanalyse verschiedener Gene zur Verfügung zu haben, ohne immer wieder Zeit in die Mikrodissektion investieren zu müssen, und zusätzlich Gewebe zu sparen. In diesem Sinne wurden Mutationsanalysen für verschiedene Gene, unter anderem *CD58* und die Analysen des Kombinationslymphoms, mit den WGA-Produkten der entsprechenden Zellen durchgeführt. Gefundene Mutationen sollten anschließend mit mikrodissektierten Ein- oder Zweizellproben bestätigt werden. Bei diesen Analysen zeigten sich sehr schlechte Bestätigungsraten der in den WGA-identifizierten Mutationen. Aufgrund des verminderten Vertrauens in die verlässliche Repräsentation des Genoms der HRS-Zellen durch das WGA-Produkt wurden die Mutationsanalysen teilweise mit Ein- und Zweizellproben erneut durchgeführt. Neben der Generierung von falsch-positiven Mutationen durch die WGA könnte die Mutationsanalyse auch in falsch-negativen Ergebnissen resultieren. So wäre es denkbar, dass Kontaminationen von einzelnen Nicht-Tumorzellen ausreichen, um größere Deletionen in den Tumorzellen zu überlagern oder

homozygote Mutationen der Tumorzellen dadurch heterozygot erscheinen zu lassen. Ein weiteres Problem bei der WGA ist, dass ein Allel bevorzugt amplifiziert werden kann, wodurch falsche Ergebnisse generiert werden können. Dies sollte durch die Verwendung von größeren Zellmengen als Ausgangsprodukt verhindert werden. Zusätzlich ist es denkbar, dass Unterschiede zwischen den WGA-Produkten und den mikrodisezierten Zellen dadurch zustande kommen, dass Mutationen subklonal auftreten. So wäre möglich, dass eine in den WGA-Produkten-gefundene Mutation nicht bestätigt werden kann, weil die zur Validierung mikrodisezierten Zellen einem anderen Subklon entstammen und somit die Mutation gar nicht besitzen. Leider konnte nicht geklärt werden, wodurch die falsch-positiven Mutationen in den WGA-Proben der beiden in dieser Arbeit analysierten primären cHL-Fälle entstanden sind. Im Allgemeinen weist die in dieser Arbeit verwendete Methode der WGA durch Verwendung einer Polymerase mit Korrekturlesefunktion eine sehr geringe Fehlerquote auf und ist im Vergleich zu anderen Methoden am besten für Mutationsanalysen geeignet (de Bourcy *et al.*, 2014). Um die Qualität der WGA-Produkte zu verbessern, wurde in aktuelleren Projekten 2000-3000, im Gegensatz zu 200 HRS-Zellen, als Startmaterial für die WGA eingesetzt. Zusätzlich erfolgte die Denaturierung der DNA nicht mehr durch Hitze sondern durch Inkubation in alkalischen Puffern, da gezeigt wurde, dass dies schonender für die DNA ist und zu einer besseren Amplifizierung des Genoms führt (Dean *et al.*, 2002).

Für einige Exons musste die PCR mit mikrodisezierten Zweizellproben mehrmals wiederholt werden, um am Ende vier bis sieben PCR-Produkte zu erhalten. In einem bzw. zwei Exons zweier Fälle war es trotz dieser Bemühung nicht möglich mehr als drei Amplifikate zu erzeugen. Für die teilweise schlechteren PCR-Effizienzen einiger Exons der unterschiedlichen cHL-Fälle können viele verschiedene Faktoren verantwortlich sein, die jedoch rein spekulativ sind. So kann grundsätzlich die DNA-Qualität der einzelnen Fälle sehr unterschiedlich sein, was vielleicht mit nicht ganz optimalen Primer- und PCR-Bedingungen zu unterschiedlichen Ergebnissen führt. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Primer-Bindestellen in einzelnen Fällen mutiert sind, wodurch die PCR-Effizienz beeinflusst werden könnte.

Die negativen Ergebnisse der *CD58*-Mutationsanalyse in den 10 untersuchten primären cHL-Fällen, schließen jedoch nicht zwangsläufig aus, dass es *CD58*-Mutationen in primären Fällen des cHL gibt. Bisherige genetische Analysen der HRS-Zellen zeigten, dass viele verschiedene Gene in geringer Frequenz mutiert sind. So sind z.B. die Gene *NFBIA*, *NFKBIE* und *PTPN1* in nur 15-20% der primären cHL-Fälle mutiert (Emmerich *et al.*, 2003; Lake *et al.*, 2009; Gunawardana *et al.*, 2014). Daher ist nicht auszuschließen, dass bei einer Untersuchung mit geringen Fallzahlen, wie in dieser Studie mit nur 10 primären Fällen, durch Zufall nur unmutierte Fälle analysiert werden. Es ist also möglich, dass bei einer Untersuchung weiterer primärer Fälle Mutationen im *CD58*-Gen gefunden werden. Im

Allgemeinen zeigten frühere Studien, dass die meisten mutierten Gene, wie z.B. *TNFAIP3*, *PTPN1* oder *NFKBIA*, im cHL zunächst in HL-Zelllinien identifiziert wurden und anschließend in primären Fällen bestätigt wurden (Cabannes *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 2009; Gunawardana *et al.*, 2014).

Dass genetische Läsionen von *CD58* in primären Fällen vorkommen, zeigen die gefunden heterozygoten Deletionen in drei cHL-Fälle, die mittels FICTION-Analysen unserer Kooperationspartner in Kiel identifiziert wurden. Zusätzlich wurden in einer kürzlich veröffentlichten Studie mittels Exom-Sequenzierung von FACS-sortierten HRS-Zellen in zwei von 10 primären Fällen Hinweise auf *CD58*-Deletionen gefunden (Reichel *et al.*, 2015). Diese wurden aber bisher nicht validiert. Unter diesem Gesichtspunkt ist die PCR-Methode zur Mutationsanalyse, die in dieser Studie angewendet wurde, kritisch zu betrachten, da bestimmte Deletionen leicht übersehen werden können. So könnte z.B. bei einer heterozygoten Deletion, die sowohl Teile eines Exons und Introns betrifft, eine Primer-Bindestelle verloren gehen, wodurch das betroffene Allel in der PCR nicht amplifiziert werden könnte und so nur das Wildtyp-Allel analysiert werden würde. Dadurch würde die Mutation mit dieser PCR-Methode nicht erkannt werden. Zusätzlich wurden weitere Möglichkeiten zur Inaktivierung von *CD58* in dieser Studie nicht untersucht. So könnten epigenetischen Mechanismen, wie z.B. die Methylierung des Promotors von *CD58*, oder post-transkriptionelle Regulierungen der mRNA von *CD58*, wie z.B. durch die Expression von miRNAs, die Ausprägung von *CD58* beeinflussen.

Dass *CD58*-Mutationen in cHL-Zelllinien häufiger vorkommen als in den primären Fällen, könnte darin begründet sein, dass *CD58* in der Interaktion der primären HRS-Zellen mit dem Mikromilieu des Tumorgewebes eine wichtige Rolle spielt, die in den cHL-Zelllinien nicht mehr gegeben ist. So wurde gezeigt, dass *CD58* für die Bindung von rosettierenden T-Zellen an die HRS-Zellen von Bedeutung ist (Fromm *et al.*, 2006). Zusätzlich wurden die cHL-Zelllinien von HRS-Zellen von Patienten in späten Stadien der Erkrankung etabliert. Daher waren die HRS-Zellen nicht mehr auf ihr Vorkommen im Lymphknoten begrenzt, sondern traten auch im peripherem Blut und Pleuralergüssen auf. In dieser Umgebung könnte der Verlust der *CD58*-Expression und die damit verbundene bessere Immunevasion von Vorteil für das Überleben der HRS-Zellen sein, da der Schutz des der HRS-Zellen-umgebenen Mikromilieus, wie z.B. durch regulatorische T-Zellen, nicht mehr gegeben ist. Es wäre allerdings auch denkbar, dass die höhere Mutationsfrequenz für *CD58* in den cHL-Zelllinien im Vergleich zu primären Fällen Therapie-induziert ist.

Zusammenfassend zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse zusammen mit den FICTION-Analysen unserer Kooperationspartner, dass destruktive Mutationen im *CD58*-Gen in cHL-Zelllinien und auch in geringerem Ausmaß in primären cHL-Fällen auftreten und eine weitere Strategie zur Immunevasion der HRS-Zellen im cHL darstellen könnten.

4.2 Transformierende Ereignisse in einem klonal verwandten Kombinationslymphom bestehend aus einem cHL und MCL

Studien mit Kombinationslymphomen bestehend aus einem cHL und NHL oder zwei NHLs bieten die einmalige Möglichkeit, Einblicke in die Mehrschritt-Pathogenese der Lymphomentstehung zu erhalten. Die Kombination aus einem cHL und einem MCL ist dabei sehr selten, so dass bisher nur vier solcher Fälle molekular beschrieben wurden (Caleo *et al.*, 2003; Tinguely *et al.*, 2003; Hayes *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einem Kooperationsprojekt ein Kombinationslymphom, bestehend aus einem cHL und MCL, bezüglich seiner Klonalität und auf transformierende Ereignisse hin untersucht. Ursprünglich wurde angenommen, dass MCL-Zellen von naiven CD5⁺IgM⁺ Prä-GC-B-Zellen abstammen, allerdings zeigten neuere Studien, dass bis zu 40% der MCL-Fälle somatisch mutierte IgV-Gene besitzen (Perez-Galan *et al.*, 2011). Dies könnte darauf hinweisen, dass in diesen Fällen die MCL-Zellen von Post-GC-B-Zellen abstammen, obwohl es auch Diskussionen darüber gibt, dass auch ein kleiner Teil der IgM⁺ B-Zellen den Prozess der SHM außerhalb des GC erfahren haben könnte (Weill *et al.*, 2009). Die durchgeführte IgV-Genanalyse von mikrodisssektierten HRS- und MCL-Zellen des hier untersuchten Kombinationslymphoms zeigten in beiden Zelltypen die gleiche IgV-Genumlagerung mit identischen somatischen Mutationen. In der Analyse zeigten die HRS-Zellen im Vergleich zu den MCL-Zellen eine wesentlich schlechte PCR-Effizienz von ca. 26% zu ca. 70%. Allerdings ist dabei zu beachten, dass von den HRS-Zellen Zweizellproben und von den MCL-Zellen 10-Zellproben in die PCR eingesetzt wurden, wodurch sich die höheren PCR-Effizienzen mit den MCL-Zellen erklären lassen. Im Allgemeinen ist die PCR langjährig etabliert und wurde bereits in zahlreichen Studien angewendet (Küppers *et al.*, 1993; Bräuninger *et al.*, 1999; Tinguely *et al.*, 2003; Seifert *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 2010; Küppers *et al.*, 2013). In diesen wurde eine PCR-Effizienz von ungefähr 24-50% mit einzelnen Zellen erreicht, wodurch die Effizienz der PCR von 26% mit den Zweizellproben der HRS-Zellen relativ gering erscheint (Küppers *et al.*, 1993; Bräuninger *et al.*, 1999). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass nur ein Teil des relativ großen Zellkerns der HRS-Zellen bei der Anfertigung der Gewebeschnitte zur Mikrodissektion angeschnitten wurde und dass ein weiterer Teil des Zellkerns während der Mikrodissektion abgetrennt oder durch den Laser zerstört wurde. Dadurch fehlten Teile des Genoms der Zelle und es stand für die nachfolgende PCR weniger oder gar kein *template* zur Verfügung. In zwei Studien von Bräuninger und Kollegen, in den Einzellproben von HRS-Zellen verwendet wurden, zeigten verschiedene Fälle unterschiedliche PCR-Effizienzen (Bräuninger *et al.*, 1999; Bräuninger *et al.*, 2003), wodurch in Kombination mit dem in dieser Arbeit analysierten Fall anzunehmen ist, dass auch die DNA-Qualität der einzelnen Fälle einen Einfluss auf die Effizienz der PCR hat. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die HRS-Zellen in den verschiedenen Fällen unterschiedliche Größen aufwiesen und

dies mit dem Erfolg der PCR korreliert. Die MCL-Zellen des hier analysierten Kombinationslymphoms zeigten mutierte IgV-Gene mit einem zu den HRS-Zellen identischen Mutationsmuster. Das deutet daraufhin, dass die gemeinsame Vorläuferzelle des Kombinationslymphoms die GC-Reaktion durchlaufen hat und somit beide Lymphome von einer gemeinsamen (Post)-GC-B-Zelle abstammen.

Da für das cHL gezeigt werden konnte, dass es von GC-B-Zellen abstammt (Küppers *et al.*, 1993) und weil in diesem klonal verwandten Kombinationslymphom die HRS- und MCL-Zellen identische somatische Mutationen in den IgV-Genen aufweisen, belegen die Ergebnisse dieser Arbeit für die MCL-Zellen einen Ursprung in (Post)-GC-B-Zellen. Im Gegensatz dazu waren die MCL-Zellen des Kombinationslymphoms in der Studie von Tinguely und Kollegen in ihren IgV-Genen unmutiert und die HRS-Zellen leicht mutiert. Dies spricht dafür, dass sich in diesem Fall die Aufteilung in zwei unterschiedliche Lymphome vermutlich bereits in einer Prä-GC-B-Zelle oder einem sehr frühem Stadium der GC-Reaktion ereignete (Tinguely *et al.*, 2003). In den anderen drei Kombinationen aus cHL und MCL wurden keine Details über somatische Mutationen in den IgV-Genen beschrieben (Caleo *et al.*, 2003; Hayes *et al.*, 2006). Somit stellt das in dieser Arbeit analysierte Kombinationslymphom ein erstes Beispiel dafür dar, dass eine Kombination aus cHL und MCL sich aus einer gemeinsamen (Post)-GC-B-Zelle entwickelten und beweist darüber hinaus den Ursprung eines IgV-Gen-mutierten MCLs aus einer (Post)-GC-B-Zelle.

Weil bisher nur wenige Informationen über gemeinsame und unterschiedliche genetische Läsionen in Kombinationslymphomen bekannt sind (Schmitz *et al.*, 2005), wurde im Rahmen dieser Arbeit nach transformierenden Ereignissen in dem Kombinationslymphom gesucht. Es wurden Mutationsanalysen für häufig mutierte Gene im cHL, nämlich *TNFAIP3*, *NFKBIA* und *SOCS1*, sowie häufig mutierte Gene im MCL, d.h. *NOTCH1* und *TP53*, durchgeführt. Obwohl Mutationen des *TNFAIP3*-Gens (40% der Fälle), des *NFKBIA*-Gens (20% der Fälle) und des *SOCS1*-Gens (40-50% der Fälle) im cHL beschrieben wurden (Jungnickel *et al.*, 2000; Weniger *et al.*, 2006; Lake *et al.*, 2009; Schmitz *et al.*, 2009), konnten in diesem Kombinationslymphom keine Mutationen in diesen Genen gefunden werden. Auch für *NOTCH1*, das regelmäßig im MCL mutiert ist (Kridel *et al.*, 2012), konnte keine Mutation nachgewiesen werden. Allerdings handelte es sich bei der Auswahl dieser Gene auch nur um einen kleinen Anteil möglicher Tumorsuppressorgene oder Onkogene, die Einfluss auf die Lymphomentstehung haben könnten. Demzufolge ist anzunehmen, dass in diesem Fall andere genetische Läsionen, die nicht entdeckt wurden, für die Entwicklung der beiden unterschiedlichen Lymphome verantwortlich sind. Eine gute Möglichkeit, um weitere Mutationen des Kombinationslymphoms zu identifizieren, wären daher *Next Generation Sequencing*-Analysen durchzuführen, wie sie kürzlich für separat auftretende HL und MCL durchgeführt wurden (Bea *et al.*, 2013; Reichel *et al.*, 2015). Bei *Next Generation*

Sequencing-Analysen eines Kombinationslymphoms könnte man einen Großteil der gemeinsamen und unterschiedlichen Mutationen zwischen beiden Lymphomen identifizieren und würde somit ein vollständigeres Bild über die Mehrschritt-Pathogenese der einzelnen Lymphome und des Kombinationslymphoms erhalten.

In der Pathogenese des MCL spielen inaktivierende Mutationen von *TP53*, die oftmals mit 17p-Deletionen assoziiert sind, eine wichtige Rolle (Greiner *et al.*, 1996). Dagegen sind für das cHL *TP53*-Mutationen nicht typisch, konnten aber in seltenen Fällen nachgewiesen werden (Montesinos-Rongen *et al.*, 1999; Maggio *et al.*, 2001; Feuerborn *et al.*, 2006). Somit stellte *TP53* ein weiteres interessantes Gen für die Suche nach transformierenden Ereignissen in diesem Kombinationslymphom dar. Mit Hilfe von PCR-Mutationsanalysen wurde in beiden Lymphomen eine somatische Austauschmutation in Exon 5 gefunden, die in einen Aminosäureaustausch an Position 163 des *TP53*-Proteins resultiert. Die pathogene Bedeutung dieser Mutation wird dadurch unterstützt, dass sie auch in weiteren Tumorentitäten gefunden und als Keimbahnmutation in einigen Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom beschrieben wurde (*IARC TP53 database*, <http://p53.iarc.fr/>).

Zusätzlich zu dieser Punktmutation identifizierten unsere Kooperationspartner durch FISH-Analysen eine klonale heterozygote *TP53*-Deletion in den HRS- und MCL-Zellen. Durch die Deletion eines Allels und die hemizygoten Mutation des übriggebliebenen Allels ergibt sich für das MCL eine Inaktivierung von *TP53* auf beiden Allelen. Für die hyperdiploiden HRS-Zellen ist die Interpretation der Mutationsanalyse komplexer, denn neben der Deletion eines *TP53*-Allels und der Punktmutation auf einem zweiten Allel wurde zusätzlich noch ein Wildtyp-Allel für *TP53* gefunden. Da in den Tumorzellen beider Lymphome exakt die gleiche Mutation im *TP53*-Gen gefunden wurde, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei der *TP53*-Mutation um ein frühes transformierendes Ereignis handelte, welches bereits in der gemeinsamen Vorläuferzelle des Kombinationslymphoms entstanden ist. Allerdings kann der Zeitpunkt der Entstehung der *TP53*-Mutation nicht geklärt werden. Die *TP53*-Mutation kann bereits vor, während oder nach der GC-Reaktion entstanden sein. Während der folgenden Entwicklung in MCL und cHL, kam es in den HRS-Zellen zu einer zufälligen Verdopplung des Wildtyp *TP53*-Allels und in einem weiteren Schritt der Pathogenese des HL zu einer Deletion von einem der beiden Wildtyp-Allele. Für die Entstehung des Kombinationslymphoms bedeuten die Ergebnisse der FISH- und Mutationsanalyse von *TP53*, dass es sich bei der *TP53*-Punktmutation um ein gemeinsames transformierendes Ereignis handelt und dass die Deletion eines der *TP53*-Allele zu einem späteren Zeitpunkt unabhängig voneinander im cHL und MCL stattgefunden hat. Eine Mutation im *TP53*-Gen wurde bereits in einem anderen analysierten Kombinationslymphom bestehend aus einem cHL und DLBCL beschrieben. Allerdings wurde die Mutation nur in den Zellen des DLBCL nachgewiesen und nicht in den HRS-Zellen (Schmitz *et al.*, 2005). Die

TP53-Mutation stellte somit ein spätes transformierendes Ereignis in der Lymphomentwicklung dar und nicht wie in dem hier beschriebenen Kombinationslymphom eine frühe Läsion in der gemeinsamen Lymphom-Vorläuferzelle, aus der sich später das cHL und MCL entwickelten.

Die Sequenzauswertungen der HRS-Zellen, zeigten nicht für alle analysierten Proben Sequenzen mit dem Wildtyp- und dem mutierten Allel, sondern auch Sequenzen die nur das Wildtyp- oder das mutierte Allel zeigten. Es ist möglich, dass durch die große Größe der HRS-Zellen bei der Anfertigung der Gewebeschnitte und anschließender Mikrodisektion nur Teile des Zellkernes isoliert wurden und dadurch nicht immer alle Allele von *TP53* als *template* für die PCR zur Verfügung standen, so dass diese nur unvollständig nachgewiesen wurden. Die einzelne Wildtyp- und heterozygot mutierte Sequenz in den MCL-Zellen und die beiden mutierten Sequenzen in den CD3⁺ T-Zellen, wurden als Ausreißer bewertet und sind höchstwahrscheinlich durch Kontaminationen während der Mikrodisektion zustande gekommen. Da die MCL-Zellen sehr dicht beieinander lagen, die Färbung für Cyclin D1 sehr stark war und die Zehnzellproben teilweise in Arealen gepickt worden waren, wurden evtl. auch falsch positive Zellen mit isoliert. Bei der Mikrodisektion der CD3⁺ T-Zellen ist es denkbar, dass eine benachbarte Tumorzelle mit isoliert wurde.

Interessanterweise zeigten die FISH- und immunhistochemischen Analysen unserer Kooperationspartner ergänzend zu den in dieser Arbeit vorgestellten Daten eine identische *CCND1/IgH*-Translokation und die Ausprägung von Cyclin D1 und OCT2 in beiden Lymphomen. Die IgH-assoziierte Translokation von *CCND1* ist ein charakteristisches Merkmal für das MCL und führt zu einer konstitutiven Expression von Cyclin D1 (Jares & Campo, 2008). Cyclin D1 gerät dabei unter die Kontrolle regulatorischer transkriptioneller Elemente des Ig-Locus und wird somit konstitutiv ausgeprägt, was vermutlich zur Pathogenese beiträgt. Die Translokation tritt vermutlich während einer fehlerhaften VDJ-Genumlagerung in der frühen B-Zellentwicklung auf, was aufgrund der Nähe des Translokationsbruchpunktes zum JH-Gensegment und der eingefügten N-Nukleotide anzunehmen ist. Es stellt somit ein sehr frühes transformierendes Ereignis dar. Die *CCND1/IgH*-Translokation wurde bereits in einem Kombinationslymphom, bestehend aus cHL und MCL, als frühes gemeinsames transformierendes Ereignis beschrieben (Tinguely *et al.*, 2003; Schmitz *et al.*, 2005). Allerdings wurde in diesem Fall das Protein Cyclin D1 nur von den MCL-Zellen ausgeprägt und nicht von den HRS-Zellen. Dies passt gut damit überein, dass im Allgemeinen das Ig-Gen in einem Teil der cHL-Fälle durch den Einfluss epigenetischer Mechanismen stillgelegt wird (Ushmorov *et al.*, 2004). Somit würde man in den HRS-Zellen keine Cyclin D1-Expression des *CCND1*-Gens, welches in die Ig-assoziierte Translokationen involviert ist, erwarten. Im Gegensatz dazu zeigt die Ausprägung von Cyclin D1 in den MCL- und HRS-Zellen in diesem Fall, dass das IgH-Allel, welches an der

Translokation mit *CCND1* beteiligt ist, in den HRS-Zellen nicht stillgelegt ist. Dies lässt vermuten, dass die aberrante Expression von Cyclin D1 nicht nur in der gemeinsamen Vorläuferzelle als Onkogen fungierte, sondern auch im vollständigen HRS-Klon. Somit zeigt dieses Kombinationslymphom zum ersten Mal im cHL die konsistente und klonale Proteinexpression eines Onkogens, das an den normalerweise in HRS-Zellen stillgelegten IgH-Locus transloziert worden ist, in den HRS-Zellen.

Das in dieser Arbeit untersuchte Kombinationslymphom ist das erste, in dem zwei genetische Läsionen, die *CCND1/IgH*-Translokation und die *TP53*-Punktmutation, gezeigt wurden, die bereits in der gemeinsamen Lymphom-Vorläuferzelle entstanden sind, noch bevor sich daraus beide Lymphomtypen entwickelten. Dabei ist nicht ganz klar, ob die Aufteilung in die beiden Lymphome bereits im GC- oder im Post-GC-Stadium der gemeinsamen Lymphom-Vorläuferzelle stattgefunden hat. Allerdings spricht die Tatsache, dass beide Lymphomarten identische Mutationen in ihren umgelagerten IgV-Genen besitzen dafür, dass die Aufteilung erst nach Beenden der GC-Reaktion in einem Post-GC-B-Zell-Stadium stattgefunden hat. Hätte sich die gemeinsame Lymphom-Vorläuferzelle während der Aufteilung der beiden Lymphome im GC befunden, wäre der Prozess der SHM noch aktiv gewesen und man würde in den HRS- und MCL-Zellen zusätzlich noch unterschiedliche Mutationen ihrer umgelagerten IgV-Gene erwarten, wie es z.B. für Kombinationen aus cHL und follikuläres Lymphom oder DLBCL gezeigt wurde (Bräuninger *et al.*, 1999; Küppers *et al.*, 2001; Rosenquist *et al.*, 2004a). Zusammenfassend lässt sich die Entstehung des untersuchten Kombinationslymphoms durch zwei mögliche Szenarien beschreiben (siehe Abbildung 13). Im ersten Szenario, entwickeln sich MCL und cHL aus einer gemeinsamen (Post-)GC-B-Zelle, die den Prozess der SHM abgeschlossen hat und bereits die *CCND1/IGH*-Translokation und die *TP53*-Mutation mit sich trägt. Durch weitere verschiedene transformierende Ereignisse, wie die unabhängig voneinander stattgefunden Deletion eines *TP53*-Allels, entwickeln sich im Anschluss die beiden unterschiedlichen Lymphome. Leider konnten weitere genetische Läsionen, die zur Pathogenese der einzelnen Lymphome beitragen, im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden. Ein zweites Szenario beschreibt die direkte Entstehung des HRS-Zellklons als Subklon der bereits entwickelten MCL-Zelle, die sowohl die *CCND1/IGH*-Translokation als auch die *TP53*-Mutation besitzt. Zusätzliche, für das cHL charakteristische transformierende Ereignisse einschließlich der *TP53*-Deletion führen anschließend zur Weiterentwicklung in ein cHL. Unabhängig davon führte im MCL eine *TP53*-Deletion auf dem zweiten Allel zur Inaktivierung von *TP53*. Auch in diesem Szenario würde man noch weitere in dieser Studie nicht identifizierte transformierende Ereignisse erwarten, die zur vollen Entwicklung der beiden unabhängigen Lymphome beigetragen haben.

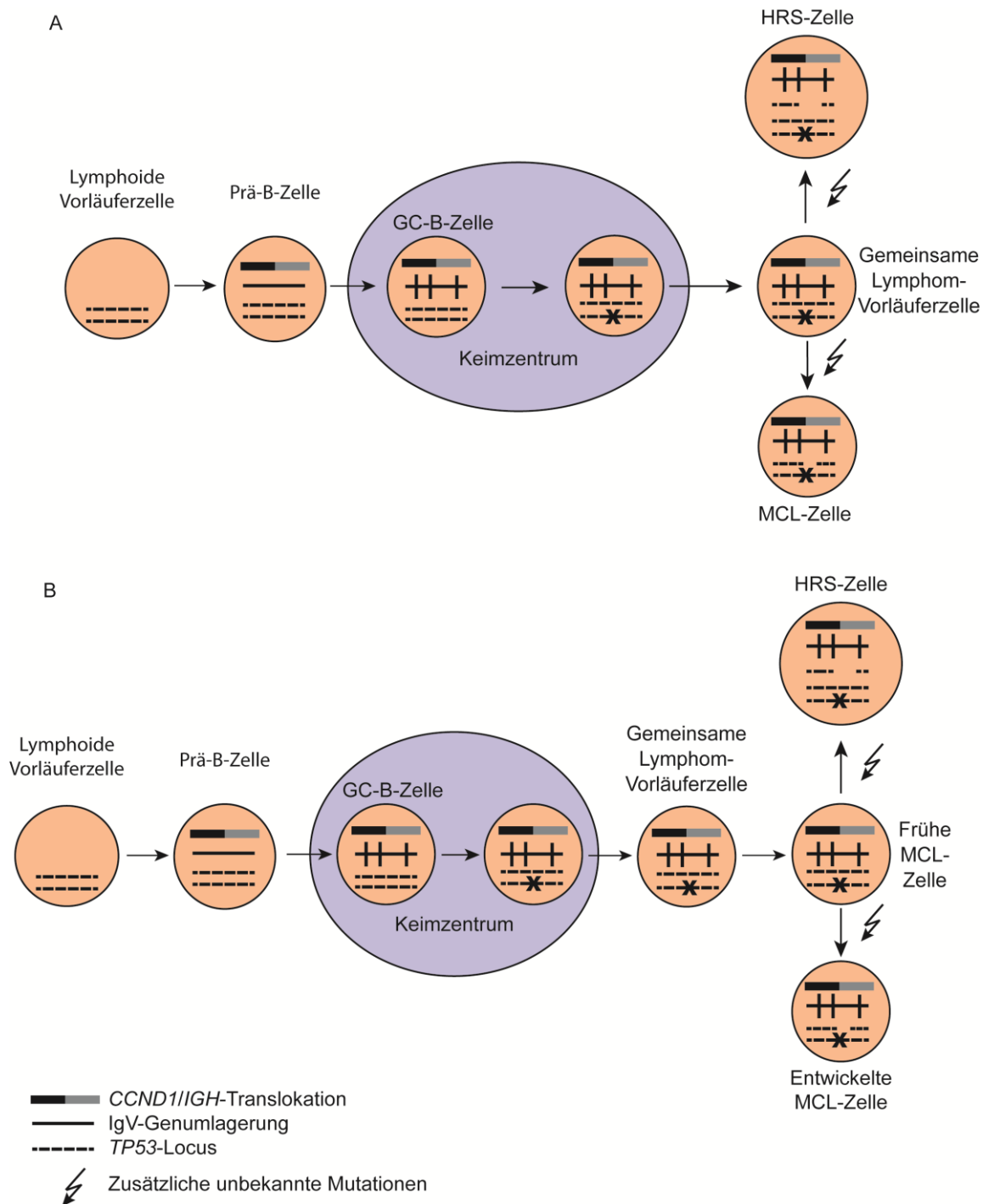


Abbildung 13: Mögliche Szenarien für die Entwicklung des MCL und cHL in dem untersuchten Kombinationslymphom. Modifiziert nach (Schneider *et al.*, 2014).

In beiden Szenarien stellt die dargestellte *CCND1/IGH*-Translokation ein frühes transformierendes Ereignis der gemeinsamen Lymphom-Vorläuferzelle und somit in der Entwicklung dieses Kombinationslymphoms dar. Des Weiteren deutet das Auftreten von IgV-Genmutationen auf einen (Post-)GC-B-Zellursprung der Lymphom-Vorläuferzelle hin. Wann genau die *TP53*-Mutation aufgetreten ist, konnte nicht genau geklärt werden, allerdings steht fest, dass diese Punktmutation bereits vor der Aufteilung in HRS- und MCL-Zelle stattgefunden haben muss, da es sich um ein gemeinsames transformierendes Ereignis handelt. Im ersten Szenario (a) entwickeln sich MCL und HL aus einer gemeinsamen (Post-)GC-B-Zelle, die den Prozess der SHM abgeschlossen hat und bereits die *CCND1/IGH*-Translokation und die *TP53*-Mutation mit sich trägt. Die beiden Lymphome entwickeln sich dann durch weitere transformierende Ereignisse, u.a. die unabhängig voneinander stattgefundenene Deletion eines *TP53*-Allels. Im zweiten Szenario (b) entwickelt sich der HRS-Zellklon als Subklon aus einer bereits entwickelten MCL-Zelle mit Post-GC-B-Zellursprung, die sowohl die *CCND1/IGH*-Translokation als auch die *TP53*-Mutation aufweist oder besitzt.

Da bei dem Patient vor der Entstehung des Kombinationslymphoms ein MCL aufgetreten ist, es eine hohe genetische Ähnlichkeit zwischen dem MCL und HL gibt und die MCL-typischen Expressionen von Cyclin D1, Sox11 und OCT2, die untypisch sind für HRS-Zellen, auch in den HRS-Zellen nachgewiesen wurden, erscheint das zweite Szenario für die Entwicklung dieses Kombinationslymphoms etwas wahrscheinlicher zu sein.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass das MCL und das HL in diesem Kombinationslymphom eng miteinander verwandt sind und sich identische IgV-Genumlagerungen mit gleichen somatischen Mutationen sowie mindestens zwei transformierende Ereignisse teilen. Die vorliegende Studie unterstützt somit die Annahme, dass sowohl frühe gemeinsame, als auch separate transformierende Ereignisse für die schrittweise Entstehung eines Kombinationslymphoms von Bedeutung sind. Wobei neben der *TP53*-Deletion leider keine weiteren separaten genetischen Läsionen, die zu einem cHL oder einem MCL führen, gefunden wurden.

4.3 Charakterisierung von humanen CD30⁺ B-Zellen

Der CD30-Rezeptor gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren und wird u.a. konstant auf Tumorzellen des cHL, des ALCL und auf einem Teil der DLBCL-Fälle ausgeprägt (Stein *et al.*, 1985; Hu *et al.*, 2013; Sotomayor *et al.*, 2014). Auf nicht-neoplastischen Zellen wird er in lymphatischen Geweben auf einigen aktivierten B- und T-Zellen exprimiert. Nur wenige B-Zellen im GC und in extrafollikulären Regionen lymphatischer Organe zeigen eine Ausprägung von CD30 und bisher ist nur wenig über die Herkunft, Eigenschaften und Differenzierungsstand dieser Zellen bekannt. Um die seltenen CD30⁺ B-Zellen zu charakterisieren und zu untersuchen ob es eine Parallele zwischen den CD30⁺ B-Zellen und den CD30-exprimierenden HRS-Zellen des cHL gibt, wurden von einem ehemaligen Mitarbeiter Dr. Enrico Tiacci Genexpressionsprofile von CD30⁺ GC- und CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen erstellt. Dabei wurden die Genexpressionsmuster der CD30⁺ B-Zellen mit denen von HRS-Zellen und weiteren B-Zellpopulationen verglichen und zeigten, dass sich die Proben der CD30⁺ B-Zellen deutlich in zwei eigenständige aber dennoch zusammen gruppierte B-Zellpopulationen anordnen und sich in der Ausprägung ihrer Gene von den anderen B-Zellpopulationen unterscheiden. Zusätzlich zeigten die Vergleiche, dass sie in ihrer Genexpression ähnlicher zu den HRS-Zellen sind als alle analysierten CD30⁻ B-Zellpopulationen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen ergänzen die Genexpressionsdaten der CD30⁺ GC- und CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen und helfen dabei diese Zellpopulationen besser zu charakterisieren. Bisher war z.B. nicht bekannt, ob es sich bei den CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen um GC-unerfahrene B-Zellen (naive B-Zellen) oder GC-erfahrene (Gedächtnis-B-Zellen) handelt oder ob die CD30⁺ GC-B-Zellen eine normale GC-Reaktion durchlaufen. Die Analysen sollten außerdem zeigen, ob beide CD30⁺ B-Zellpopulationen

miteinander verwandt sind. Zusätzlich wurde nach Hinweisen gesucht, die zeigen, dass die CD30⁺ B-Zellen möglicherweise eine Vorläuferzelle der HRS-Zellen darstellen könnten.

Im Allgemeinen ist anzumerken, dass sich die Analyse der CD30⁺ B-Zellen recht anspruchsvoll gestaltete und nicht immer erfolgreich gewesen ist. Das Hauptproblem dabei war vor allem, dass die CD30⁺ B-Zellen nur einen Anteil von 0,1 – 0,3% der tonsillären Zellen ausmachen und somit oft nur sehr wenige Zellen für die einzelnen Untersuchungen zur Verfügung standen.

4.3.1 Phänotypische Analyse von CD30⁺ B-Zellen

Bei den phänotypischen Analysen der CD30⁺ B-Zellpopulationen zeigte sich eine große Ähnlichkeit zwischen den CD30⁺ GC- und CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen bezüglich ihrer Ausprägung der untersuchten Oberflächenmarker. Diese Ähnlichkeit zeigte sich auch im *Unsupervised Hierarchical Clustering* der Genexpressionsprofile durch die deutliche Anordnung in zwei eigenständige aber dennoch zusammen gruppierte B-Zellpopulationen. Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten, dass ungefähr 2/3 der analysierten CD30⁺ GC-B- und CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen einen Klassenwechsel vollzogen haben und dass in jeweils ca. 50% der Zellen IgG und in ca. 20% IgA auf ihrer Oberfläche ausgeprägt werden. Da der Klassenwechsel hauptsächlich im GC stattfindet, ist dies ein erster Hinweis darauf, dass auch die CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen die GC-Reaktion durchlaufen haben. Zusätzlich konnte für beide CD30⁺ B-Zellpopulationen, wie auch für die CD30⁻ GC-B-Zellen, gezeigt werden, dass ein großer Anteil der Nicht-klassengewechselten IgM⁺ B-Zellen zusätzlich nur schwach oder kein IgD auf ihrer Oberfläche exprimieren. Dabei war der Anteil der IgM⁺IgD^{-/low} B-Zellen in den CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen mit durchschnittlich 21% etwas höher als in den beiden GC-B-Zellpopulationen mit 6% bzw. 9%. Bei diesen Zellen könnte es sich um aktivierte B-Zellen handeln, die typischerweise bereits im GC anfangen IgD runter zu regulieren (Pascual *et al.*, 1994). Darüber hinaus zeigen ca. 8% der CD30⁺ GC-B-Zellen und 12% der CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen, ähnlich viele wie in den CD30⁻ GC-B-Zellen mit 9%, einen IgD-only-Phänotyp. Bei den IgD-only B-Zellen handelt es sich um eine eigenständige B-Zellpopulation, deren Zellen stark somatisch mutiert sind und zu Gedächtnis-B-Zellen oder Plasmazellen ausdifferenzieren können (Liu *et al.*, 1996). Auffällig ist, dass die prozentualen Anteile der klassengewechselten B-Zellen, der IgM⁺ B-Zellen und der IgD-only B-Zellen der einzelnen Spender zusammengenommen nie 100% ergeben. Das liegt zum einen darin begründet, dass nicht für jeden Donor alle Isotypen gefärbt wurden (Spender 1-6 und 10) und zusätzlich wurden die *Gates* zur Berechnung der prozentualen Anteile so stringent gesetzt, dass dadurch eventuell einige Zellen ausgeschlossen wurden. Zusätzlich ist zu bedenken, dass die Werte für die Anteile der IgM⁺ Zellen und die Anteile der IgM⁺IgD^{-/low} und die der IgD-only Zellen mit unterschiedlichen Färbestrategien ermittelt wurden und dass daher diese auch nicht einfach verglichen werden können. Weiterhin fallen zwischen den

einzelnen Spender die großen Schwankungen der prozentuellen Anteile der ausgeprägten Isotypen auf. Verursacht werden diese Unterschiede vermutlich zum einen durch die Art der Infektion und zum anderen von der Phase der Infektion in der sich die Tonsille zum Zeitpunkt der Entnahme befand. So können z.B. zu Beginn einer Infektion zunächst IgM⁺ B-Zellen überwiegen, die meistens im weiteren Verlauf von klassengewechselten Zellen ersetzt werden.

Die Oberflächenexpression von CD27 wird als ein charakteristisches Merkmal für Gedächtnis-B-Zellen betrachtet und ist klassischerweise als genereller Marker für somatisch mutierte IgV-Gene akzeptiert (Klein *et al.*, 1998b). Allerdings wurde in mehreren Studien gezeigt, dass es auch eine kleine Population von CD27⁻ Gedächtnis-B-Zellen gibt (Fecteau *et al.*, 2006; Weston-Bell *et al.*, 2009). Zusätzlich wurde in Mäusen gezeigt, dass es einen kleinen Anteil GC-unabhängiger Gedächtnis-B-Zellen gibt, die keine somatischen Mutationen in ihren IgV-Genen tragen (Takemori *et al.*, 2014). Außerdem wird CD27 auch bereits auf GC-B-Zellen hochreguliert und auf Plasmazellen stark ausgeprägt (Yoshida *et al.*, 2010; Przekopowicz *et al.*, 2015). Die in dieser Arbeit durchgeführten Färbungen für CD27 zeigen, dass fast alle Zellen beider CD30⁺ B-Zellpopulationen und der CD30⁻ GC-B-Zellen positiv für CD27 sind und somit entweder GC-B-Zellen oder Post-GC-B-Zellen darstellen. Beim Vergleich der MFI-Verhältnisse, gebildet aus dem Quotienten der MFI der CD27-gefärbten Zellen und der MFI der Isotyp-Kontrolle der beiden GC-B-Zellpopulationen und der CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen, scheint die Expression von CD27 in den CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen stärker zu sein. So zeigen die beiden GC-B-Zellpopulationen einen nahezu identischen Mittelwert von 2,6 in den CD30⁺ GC-B-Zellen und 2,5 in den CD30⁻ GC-B-Zellen. Die CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen hingegen weisen einen durchschnittlichen Quotienten von 6,7 auf. Betrachtet man den Wert von Spender 7 als Ausreißer, verringert sich der durchschnittliche Quotient auf 4,9 und ein ungepaarter zweiseitiger T-Test zeigt die statistische Signifikanz des Unterschiedes in der CD27-Expression der beiden CD30⁺ B-Zellpopulationen (p -Wert=0,025). Dies unterstützt die Vermutung, dass es sich bei den CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen um Post-GC-B-Zellen handelt, da gezeigt worden ist, dass Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen mehr CD27 auf ihrer Oberfläche tragen als GC-B-Zellen (Przekopowicz *et al.*, 2015).

Die Ergebnisse dieser Analyse zeigen, dass die CD30⁺ GC-B-Zellen phänotypisch sehr ähnlich zu den CD30⁻ GC-B-Zellen sind und dass die meisten CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen CD27 auf ihrer Oberfläche exprimieren und ein hoher Anteil von ihnen klassengewechselt ist und somit wahrscheinlich eine Subpopulation von Post-GC-Gedächtnis-B-Zellen darstellen.

4.3.2 IgV-Genanalyse von CD30⁺ B-Zellen

Für die weitere Charakterisierung der beiden CD30⁺ B-Zellpopulationen wurden CD30⁺ GC-B-Zellen und CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen aus tonsillärem Gewebe isoliert und von den

sortierten Zellaliquots eine IgV-Gen-PCR durchgeführt. Für die Analyse standen Sequenzen von insgesamt vier Tonsillen zur Verfügung. Für alle Sequenzen wurden die IgV-Genumlagerungen identifiziert, überprüft, ob die Sequenz produktiv ist (d.h. sich die CDR3 im Leseraster befindet, kein vorzeitiges Stopcodon generiert wurde und kein VH-Pseudogen verwendet wurde), die Mutationsfrequenz berechnet, das R/S-Verhältnis der FR ermittelt und auf Besonderheiten wie verkrüppelnde Mutationen oder das Auftreten von Klonen untersucht.

Für die CD30⁺ GC-B-Zellen konnte gezeigt werden, dass nahezu alle analysierten IgV-Genumlagerungen somatisch mutiert waren und die mittlere Mutationsfrequenz der IgV-Gene in den vier Tonsillen bei ca. 4,6-8% lag. Damit liegen die Mutationsfrequenzen der IgV-Gene von drei der analysierten Tonsillen in einem Bereich der typisch ist für gewöhnliche GC-B-Zellen und die Mutationsfrequenz der IgV-Gene einer Tonsille ist mit 8% etwas höher (Klein *et al.*, 1998a). Die durchschnittlichen R/S-Werte der FR liegen in den CD30⁺ GC-B-Zellen der einzelnen Spender bis auf eine Ausnahme in einem Bereich von 1,4-1,9, der auch typisch ist für selektionierte GC-B-Zellen (Klein *et al.*, 1998a). Somit zeigen die CD30⁺ GC-B-Zellen auch in den IgV-Genanalysen starke Ähnlichkeiten zu gewöhnlichen GC-B-Zellen. Im Gegensatz dazu waren die IgV-Genumlagerungen der CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen in drei von vier untersuchten Tonsillen nur zu 79% bis 92% mutiert. In einem der Spender waren sogar 67% der Zellen unmutiert. Die mittlere Mutationsfrequenz der CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen liegt mit 2,9% bis 8,2% ungefähr in einem Bereich von Post-GC-B-Zellen und auch die R/S-Werte der FR liegen mit 1,3 bis 1,8 etwas niedriger als die der CD30⁺ GC-B-Zellen und sind typisch für gut selektionierte Post-GC-B-Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei einem großen Anteil der CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen um eine Art Post-GC-B-Zellen handelt, deren IgV-Genumlagerungen während der GC-Reaktion somatisch mutierten und deren BCRs sehr gut selektiert wurden. Bei den unmutierten CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen, die ungefähr einen Anteil von 10-20% ausmachen (ca. 67% in Tonsille 6), handelt es sich wahrscheinlich um GC-erfahrene Gedächtnis-B-Zellen, die das GC sehr schnell wieder verlassen haben noch bevor der Prozess der SHM stattgefunden hat oder aber um unmutierte Gedächtnis-B-Zellen, die nicht die GC-Reaktion durchlaufen haben. So wurde kürzlich in Mäusen gezeigt, dass es eine Gruppe von somatisch unmutierten Gedächtnis-B-Zellen gibt, die sich in einer T-Zell-abhängigen Immunantwort entwickeln. Diese B-Zellen nehmen nicht an der GC-Reaktion teil, sondern entstehen in der frühen Phase der Immunantwort noch vor der Entstehung des GCs (Takemori *et al.*, 2014). Diese Daten würden erste Hinweise darauf geben, dass es auch im Menschen eine Population von unmutierten GC-unabhängigen Gedächtnis-B-Zellen gibt. Weitere Studien sind allerdings notwendig um diesen Punkt zu klären. Des weiteren könnten die unmutierten CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen auch aktivierte B-Zellen vor der Differenzierung in kurzlebige Plasmazellen darstellen, die aus einer

T-Zell-unabhängigen Immunreaktion entstammen, wie sie z.B. durch die starke Kreuzvernetzung des BCRs ausgelöst werden kann.

Innerhalb der CD30⁺ GC-B-Zellen wurden in drei (1,3 und 4) der vier analysierten Spender klonal verwandte IgV-Gensequenzen gefunden, die eventuell Mitglieder eines größeren Klons sind. Interessanterweise zeigte der Klon in Spender 3 ein Klonmitglied innerhalb der analysierten CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass diese Zellen miteinander verwandt sind. Ob sich die extrafollikuläre CD30⁺ B-Zelle direkt aus der CD30⁺ GC-B-Zelle entwickelt hat oder ob beide Zellen zwar eine gemeinsame Vorläuferzelle besitzen aber unterschiedliche Differenzierungswege aufweisen, ist unklar.

Der deutlich niedrigere R/S-Wert der FR von 1,8 der CD30⁺ Nicht-GC-B-Zelle im Vergleich des gemittelten R/S-Wertes der FR von 2,4 der drei Mitglieder eines Klons der CD30⁺ GC-B-Zellen, deutet erneut eine bessere Selektion für einen funktionierenden BCR in den CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen an. Die im geringen Maße gefundene intraklonale Diversität in den CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen (Spender 3 und 4), gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass ein Teil dieser Population GC-erfahren ist.

Die in dieser Arbeit verwendete PCR und Sequenzierungs-Methode ist sehr aufwendig und hat den Nachteil, dass nur ein Bruchteil der isolierten CD30⁺ B-Zellen in der IgV-Genanalyse mit einbezogen wird. Daher würde man heutzutage eine IgV-Gen-Sequenzierung mittels *Next Generation Sequencing* anstreben, wie sie auch schon in anderen Studien zur Analyse von IgV-Genen durchgeführt wurde (Arnaout *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011; Cowan *et al.*, 2015). Durch die größere Menge an Daten könnte man einen besseren Einblick in die Komposition des IgV-Gen-Repertoires und der Klonalität der einzelnen CD30⁺ B-Zellpopulationen gewinnen.

Verkrüppelnde Mutationen, wie sie in ca. 25% der cHL-Fälle vorkommen (Küppers *et al.*, 1994; Kanzler *et al.*, 1996b; Marafioti *et al.*, 2000), wurden nur sehr selten gefunden und es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesen Mutationen um Polymerasefehler handelte. Daher gibt es bezüglich dieses Aspektes keinen Anhaltspunkt auf Gemeinsamkeiten zwischen CD30⁺ B-Zellen und HRS-Zellen.

4.3.3 Validierung der Genexpressionsprofile von CD30⁺ B-Zellen

Die in den Genexpressionsprofilen ermittelten unterschiedlich starken Ausprägungen von ausgewählten Genen zwischen den einzelnen B-Zellpopulationen sollten durch qRT-PCR- und Western Blot-Analysen mit sortierten Zellen validiert werden. Größtenteils konnten diese Unterschiede zwischen den einzelnen B-Zellpopulationen durch die durchgeführten Analysen bestätigt werden. So konnte in der bioinformatischen Auswertung durch einen paarweisen Vergleich der gewöhnlichen GC-B-Zellen mit den CD30⁺ GC-B-Zellen gezeigt werden, dass in den gewöhnlichen GC-B-Zellen einige B-Zell-Differenzierungsmarker, wie z.B. *BACH2* und *FOXP1* hochreguliert sind (Daten nicht gezeigt). *BACH2* ist ein entscheidender Faktor für die

Unterdrückung der Plasmazell-Differenzierung und begünstigt gleichzeitig den Prozess des Klassenwechsels im GC (Shaffer et al., 2002). Auch die qRT-PCR-Analysen bestätigen, dass *BACH2* in den CD30⁻ GC-B-Zellen signifikant stärker ausgeprägt ist. Die in den bioinformatischen Auswertungen gefundene 4-fach höhere Ausprägung von *FOXP1*, einem wichtigen Marker in der frühen B-Zell-Entwicklung, in den CD30⁻ GC-B-Zellen im Vergleich zu den CD30⁺ GC-B-Zellen konnte nur bedingt bestätigt werden. Zwar konnte anhand der ermittelten Ct-Werte eine im Mittel 3,5-fache höhere Ausprägung in den CD30⁻ GC-B-Zellen gemessen werden, diese war mit einem p-Wert von 0,052 jedoch knapp nicht signifikant. Es ist wahrscheinlich, dass durch die Analyse weiterer biologischer Replikate die erhöhte Regulation von *FOXP1* in den CD30⁻ GC-B-Zellen im Vergleich zu CD30⁺ GC-B-Zellen auch signifikant bestätigt werden kann. Im Gegensatz zu *BACH2* und *FOXP1* waren in den CD30⁺ GC-B-Zellen z.B. *CCL22* und viele Gene die für die Zellproliferation wichtig sind, u.a. *MYC*, im Vergleich zu den CD30⁻ GC-B-Zellen hochreguliert. Zusätzlich zeigte *CCL22* eine erhöhte Expression in den CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen im Vergleich zu Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen. In allen drei Vergleichen wurde eine signifikant höhere Expression von *CCL22* in den CD30⁺ Zellen in den qRT-PCRs gefunden und so die Ergebnisse der Analysen der Genexpressionsprofile bestätigt. *CCL22* bindet an den Chemokinrezeptor CCR4 welcher von TH2-Zellen und regulatorischen T-Zellen exprimiert wird (Imai et al., 1999; Iellem et al., 2001) und könnte somit auch eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen CD30⁺ B-Zellen und T-Zellen spielen.

Die starke Ausprägung von *MYC* in den CD30⁺ GC-B-Zellen im Vergleich zu den CD30⁻ GC-B-Zellen konnte in den qRT-PCR- und Western Blot-Analysen bestätigt werden. *MYC* ist ein Proliferationsmarker und es wurde gezeigt, dass *MYC* im GC für die Rezirkulation der positiv-selektionierten GC-B-Zellen zwischen heller und dunkler Zone, mit anschließender Durchführung einer neuen Runde von Proliferation, SHM und Affinitätsselektion, benötigt wird (De Silva & Klein, 2015). Diese *MYC*-positiven Zellen könnten die CD30⁺ GC-B-Zellen darstellen. Auch Cattoretti beschreibt in seinen Arbeiten, dass es unterschiedliche Populationen von CD30⁺ B-Zellen gibt, die sich innerhalb und außerhalb des GCs befinden (Cattoretti et al., 2006; Cattoretti, 2013). Übereinstimmend mit den Ergebnissen in dieser Arbeit werden die CD30⁺ B-Zellen als *MYC* positiv beschrieben. Cattoretti führt aus, dass der Phänotyp der extrafollikulären CD30⁺*MYC*⁺ B-Zellen dem von aktivierten B-Zellblasten ähnelt. Ein Teil dieser Zellen könnte bald in das GC eintreten und ein anderer Teil könnte an einer GC-unabhängigen Immunantwort teilnehmen. Die CD30⁺ GC-B-Zellen werden als B-Zellblasten mit Lokalisierung zwischen dunkler und heller Zone des GCs beschrieben. Sie sollen eine neue GC-B-Zellpopulation darstellen, die in die dunkle Zone rezirkulieren. Diese Annahmen werden durch unsere Daten weitgehend unterstützt (siehe 4.3.4).

Auch die erhöhte Expression von *PRDM1* in den $CD30^+$ Nicht-GC-B-Zellen im Vergleich zu den $CD30^+$ GC-B-Zellen konnte mittels qRT-PCR bestätigt werden. *PRDM1* ist ein entscheidender Faktor für die Differenzierung von GC-B-Zellen in Plasmazellen (Shaffer et al., 2002). Durch IRF4 wird *PRDM1* im GC induziert und hemmt *BCL6*. *BCL6* wiederum reguliert negativ die Expression von *PRDM1*. Durch Aufhebung der negativen Regulation von *PRDM1* durch *BCL6* beim Verlassen des GCs erfolgt die Differenzierung in Plasmazellen (Victoria & Nussenzweig, 2012; Basso & Dalla-Favera, 2015). Daher deutet die erhöhte Ausprägung von *PRDM1* in den $CD30^+$ Nicht-GC-B-Zellen möglicherweise eine Vorbereitung zur Differenzierung in Plasmazellen an.

EBI2 ist eines der Gene, die typischerweise in Post-GC-B-Zellen höher ausgeprägt waren als in GC-B-Zellen. Allerdings konnte die 3-fach höhere Ausprägung von *EBI2* in den $CD30^+$ Nicht-GC-B-Zellen im Vergleich zu den $CD30^+$ GC-B-Zellen, mittels qRT-PCR nicht bestätigt werden. Wegen der relativ großen Streuung der Ct-Werte zwischen den untersuchten Tonsillen innerhalb der $CD30^+$ Nicht-GC-B-Zellen, würde eine Analyse von weiteren Spendern möglicherweise ein deutlicheres Ergebnis hervorbringen. *EBI2* wird in Folge der B-Zell-Aktivierung durch BCR- oder CD40-Stimulation hochreguliert. Während der GC-Reaktion wird weniger *EBI2* exprimiert. Zum Verlassen des GC und zum Wiedereintritt in die äußere Follikelzone erfolgt eine Hochregulierung von *EBI2*. Daher könnte *EBI2* in den $CD30^+$ Nicht-GC-B-Zellen einen wichtigen Faktor für die Bewegung und Lokalisierung zwischen GC und äußerer Follikelzone darstellen, wie es für herkömmliche B-Zellen gezeigt wurde (Pereira et al., 2009).

4.3.4 Schlussfolgerung der Analysen zur Charakterisierung von $CD30^+$ B-Zellen

Bei den $CD30^+$ B-Zellen scheint es sich um eine eigenständige Subpopulation von B-Zellen zu handeln, die sich nicht nur in ihrer Lokalisierung im Gewebe sondern auch funktional in mind. zwei Gruppen unterteilt. So lassen sich $CD30^+$ GC- von $CD30^+$ Nicht-GC-B-Zellen unterscheiden. Trotz der klaren Unterscheidung in den Genexpressionsanalysen ähneln sich $CD30^+$ GC-B-Zellen und herkömmliche $CD30^-$ GC-B-Zellen in vielen Aspekten. So wiesen ca. 2/3 dieser Zellen ähnlich zu den $CD30^-$ GC-B-Zellen einen Klassenwechsel auf. Zusätzlich präsentierten sie eine ähnliche Ausprägung von CD27 auf ihrer Oberfläche und zeigten bei der IgV-Genanalyse typische Merkmale von klassischen GC-B-Zellen. Dazu gehört, dass die analysierten IgV-Genumlagerungen somatisch mutiert waren, sowie das ihre durchschnittliche Mutationsfrequenz und ihr R/S-Verhältnis der FR ungefähr in einem Bereich lag der für GC-B-Zellen beschrieben wurde (Klein et al., 1998a). Neben der Expression des Aktivierungsmarkers CD30, der diese Zellpopulationen definiert, zeigt sich ein weiterer wesentlicher Unterschied in der Expression von MYC. So sind die $CD30^+$ GC-B-

Zellen im Gegensatz zu CD30⁻ GC-B-Zellen immer MYC positiv (Cattoretti *et al.*, 2006). Für MYC wurde beschrieben, dass es der entscheidende Faktor für die Rezirkulation in die dunkle Zone von GC-B-Zellen ist (Lin *et al.*, 2012; Nie *et al.*, 2012). Auch Cattoretti beschrieb die CD30⁺ B-Zellen bereits als neue GC-B-Zellpopulation, die rezirkulierende GC-B-Zellen darstellt (Cattoretti, 2013). Diese Schlussfolgerungen werden von unseren Daten weiter gestützt. Besonders die Genexpressionsanalysen zeigten eine erhöhte Expression von Genen, die in der Nukleotid-Synthese, Zellproliferation, Protein-Biosynthese und mitochondrialen Funktion beteiligt sind, und somit Prozesse darstellen, die diese Zellen auf eine weitere Runde von Proliferation in der dunklen Zone des GC vorbereiten.

Dass die CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen sehr viele Ähnlichkeiten, aber auch deutliche Unterschiede zu den CD30⁺ GC-B-Zellen besitzen, wurde nicht nur durch die Analyse ihrer Genexpression gezeigt. Einerseits zeigen beide CD30⁺ B-Zellpopulationen einige Gemeinsamkeiten wie z.B. die Ausprägung von CD30 und MYC, einen ähnlichen Anteil klassengewechselter Zellen und eine ähnliche durchschnittliche Mutationsfrequenz ihrer mutierten IgV-Gene. Andererseits lassen die stärkere Expression von CD27 und das niedrigere R/S-Verhältnis der FR im Vergleich zu den CD30⁺ GC-B-Zellen eher einen Post-GC-Phänotyp vermuten. Zusätzlich zeigen die CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen in den Genexpressionsanalysen eine weniger starke Ausprägung von klassischen GC-Markern, dafür aber eine stärkere Expression von Genen die für Post-GC-B-Zellen charakteristisch sind, wie z.B. *EBI2* und *PRDM1*. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei einem großen Anteil dieser Zellen um aktivierte und proliferierende extrafollikuläre Zellen handelt, die GC-erfahren sind und sich möglicherweise zu Plasmazellen weiterentwickeln. Bei den Zellen, die unmutierte IgV-Gene tragen kann nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich um eine Art Gedächtnis-B-Zellen handelt, die sich unabhängig vom GC entwickeln (Takemori *et al.*, 2014) oder ob sie das GC bereits nach kurzer Zeit verlassen haben bevor somatische Mutationen in ihren IgV-Genen eingefügt werden konnten.

Die Genexpressionsprofile der B-Zellsubpopulationen und HRS-Zellen des cHL zeigten die größte Ähnlichkeit der HRS-Zellen zu den CD30⁺ B-Zellpopulation. Zusätzlich zur Ausprägung von CD30 sind die HRS-Zellen und CD30⁺ B-Zellen positiv für MYC und zeigen eine starke Proliferation. Außerdem fällt auf, dass die CD30⁺ B Zellen nicht im peripheren Blut zirkulieren, sondern in lymphatischen Geweben lokalisiert sind, wo sie in engen Kontakt zu anderen Zellen stehen. Dies ist ähnlich zu den selten metastasierenden HRS-Zellen, bei denen zusätzlich eine starke Interaktion mit Zellen des Mikromilieus und eine daraus resultierende Abhängigkeit vom umgebenden Mikromilieu gezeigt wurde (Küppers, 2012). Ob eine solche Abhängigkeit vom Mikromilieu auch für die CD30⁺ B-Zellen zutrifft bzw. welche Interaktionen der CD30⁺ B-Zellen mit anderen Zellen des Gewebes stattfinden, sollte in zukünftigen Studien untersucht werden. Trotz dieser Ähnlichkeiten kann die Herkunft der

HRS-Zellen von den CD30⁺ B-Zellen nicht abgeleitet werden, da die große Ähnlichkeit in den Genexpressionsprofilen auch allein von einem gleichartigen CD30-Aktivierungssignal geprägt sein kann. Genauso wurden in den CD30⁺ B-Zellen keine verkrüppelnden Mutationen gefunden, die ein weiteres Indiz für eine mögliche Abstammung der HRS-Zellen von den CD30⁺ B-Zellen dargestellt hätten.

Obwohl bisher wenig über die Biologie des CD30-Rezeptor bekannt ist, ist CD30, besonders durch seine charakteristische Ausprägung auf den Tumorzellen des cHL und ALCL, sowie für einen Teil der DLBCL-Fälle, ein sehr attraktives Ziel für die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern (Stein *et al.*, 1985; Hu *et al.*, 2013; Sotomayor *et al.*, 2014). So wurde in mehreren klinischen Studien die sehr gute Wirksamkeit von Brentuximab Vedotin, ein mit Zytostatika-gekoppelter CD30-Antikörper, in der Therapie von rezidivierenden oder therapierefraktären CD30⁺ Lymphome gezeigt (Younes *et al.*, 2010; Rothe *et al.*, 2012). Aufgrund dieser Erfolge werden derzeit weitere Einsatzmöglichkeiten für Brentuximab Vedotin geprüft. So laufen z.B. klinische Studien zur Anwendung von Brentuximab Vedotin in der Erstbehandlung von fortgeschrittenen cHL (Younes *et al.*, 2013). In diesen Studien zeigte sich, dass Brentuximab Vedotin eine gute Verträglichkeit mit geringen Nebenwirkungen aufweist. Trotzdem ist zu bedenken, dass ein Teil der gesunden B- und T-Zellen CD30 auf ihrer Oberfläche ausprägen und diese somit auch durch die Behandlung mit Brentuximab Vedotin eliminiert werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt, handelt es sich bei den CD30⁺ B-Zellen um distinkte B-Zellpopulationen mit spezifischen Funktionen. Daher könnte die Behandlung mit Brentuximab Vedotin und der dadurch bedingte Verlust dieser B-Zellen zu einer Beeinträchtigung immunologischer Abläufe führen. Somit sind weitere Untersuchungen zur Funktion der CD30⁺ B-Zellpopulationen nicht nur wichtig, um einen Teil des Immunsystems weiter zu charakterisieren, sondern könnten auch ein besseres Verständnis der auftretenden Nebenwirkungen einer Therapie mit Brentuximab Vedotin ermöglichen.

5 Zusammenfassung der Arbeit

Die vorliegende Dissertation stellt drei Studien vor, die Teilbereiche umfassender Projekte sind, die zusammen mit verschiedenen Kooperationspartnern durchgeführt wurden.

Im ersten Teilprojekt der Arbeit wurden Mutationsanalysen von *CD58* im klassischen Hodgkin Lymphom (cHL) durchgeführt, da Mutationen im *CD58*-Gen als Mechanismus der Immunevasion in Non-Hodgkin Lymphomen (NHL) beschrieben wurden und Immunevasion auch eine wichtige Bedeutung für die Hodgkin und Reed-Sternberg (HRS)-Zellen des cHL hat. Mittels PCR wurden in 3 von 7 cHL-Zelllinien Mutationen, die in vorherigen Arbeiten identifiziert worden sind, bestätigt. Anschließende durchflusszytometrischen Analysen zeigten deren destruktive Auswirkung auf die Proteinexpression von *CD58* in den mutierten cHL-Zelllinien. Um zu Überprüfen ob sich Mutationen des *CD58*-Gens auch in primären cHL-Fällen finden lassen, wurde eine Mutationsanalyse von mikrodisezierten HRS-Zellen für die kodierenden Exons von *CD58* durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen zeigte allerdings, dass in keinem der 10 analysierten primären cHL-Fälle Mutationen nachweisbar waren.

In einem weiteren Teilprojekt wurden die mikrodisezierten Tumorzellen eines Kombinationslymphoms bestehend aus einem cHL und Mantelzell-Lymphom (MCL) genetisch untersucht. Kombinationslymphome sind sehr seltene Kombinationen aus einem HL und NHL oder zwei NHL in einem Patienten, die meistens klonal miteinander verwandt sind. Somit stellen sie interessante Modelle dar, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede der beteiligten Lymphome zu untersuchen und Einblicke in die Mehrschrittpathogenese der Lymphomentstehung zu erhalten. Durch IgV-Genanalysen der HRS-Zellen des cHL und der Tumorzellen des MCL konnte die klonale Verwandtschaft der beiden Lymphome dieses Kombinationslymphoms gezeigt werden. Um die Pathogenese des Kombinationslymphoms besser zu verstehen, wurden Mutationsanalysen für häufig mutierte Gene im cHL und MCL, d.h. *TNFAIP3*, *NFKBIA*, *SOCS1*, *NOTCH1* und *TP53*, durchgeführt. Dabei waren jedoch bis auf *TP53* alle Gene unmutiert. Die Tumorzellen beider Lymphome wiesen dieselbe Punktmutation in *TP53* auf, wobei die MCL-Zellen nur ein mutiertes Allel und die HRS-Zellen zusätzlich ein unmutiertes Allel zeigten. Zusammen mit den FICTION-Analysen unserer Kooperationspartner deutet dies darauf hin, dass in beiden Lymphomen zusätzlich eine unabhängige Deletion eines *TP53*-Allels stattgefunden haben muss. Zusammenfassend lassen die hohe genetische Verwandtschaft der beiden Lymphome und weitere Daten von Kooperationspartner eine subklonale Entstehung des cHL aus dem MCL als ein mögliches Szenario zur Entwicklung dieses Kombinationslymphoms vermuten.

Im dritten Teilprojekt dieser Arbeit wurden die humanen *CD30*⁺ B-Zellen, die innerhalb von Keimzentren (GC) und in extrafollikulären Regionen von sekundären lymphatischen Organen lokalisiert sind und über die bisher sehr wenig bekannt ist, charakterisiert. Zur Verfügung

gestellte Genexpressionsdaten zeigten, dass die CD30⁺ B-Zellen eine eigenständige B-Zellpopulation darstellen, die eine große Ähnlichkeit zu den ebenfalls CD30⁺ HRS-Zellen des cHLs aufweisen. Kennzeichnend für alle CD30⁺ Zellen war eine starke MYC-Ausprägung, die mittels qRT-PCR und Western Blot-Analysen validiert werden konnte. Zusätzliche durchflusszytometrische Untersuchungen und IgV-Genanalysen in Kombination mit den Genexpressionsdaten zeigten, dass CD30⁺ GC-B-Zellen normalen GC-B-Zellen entsprechen und vermutlich rezirkulierende positiv selektionierte GC-B-Zellen darstellen. Im Gegensatz dazu stellen die CD30⁺ Nicht-GC-B-Zellen aktivierte und proliferierende extrafollikuläre Zellen dar, die größtenteils GC-erfahren sind und sich möglicherweise zu Plasmazellen weiterentwickeln.

6 Literaturverzeichnis

- Aizawa, S., Nakano, H., Ishida, T., Horie, R., Nagai, M., Ito, K., Yagita, H., Okumura, K., Inoue, J. & Watanabe, T. (1997) Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 5 and TRAF2 are involved in CD30-mediated NFkappaB activation. *J Biol Chem*, **272**, 2042-2045.
- Allen, C.D., Ansel, K.M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N. & Cyster, J.G. (2004) Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol*, **5**, 943-952.
- Alt, F.W., Rathbun, G., Oltz, E., Taccioli, G. & Shinkai, Y. (1992) Function and control of recombination-activating gene activity. *Ann N Y Acad Sci*, **651**, 277-294.
- Altomonte, M., Gloghini, A., Bertola, G., Gasparollo, A., Carbone, A., Ferrone, S. & Maio, M. (1993) Differential expression of cell adhesion molecules CD54/CD11a and CD58/CD2 by human melanoma cells and functional role in their interaction with cytotoxic cells. *Cancer Res*, **53**, 3343-3348.
- Anagnostopoulos, I., Herbst, H., Niedobitek, G. & Stein, H. (1989) Demonstration of monoclonal EBV genomes in Hodgkin's disease and Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma by combined Southern blot and in situ hybridization. *Blood*, **74**, 810-816.
- Annunziata, C.M., Safiran, Y.J., Irving, S.G., Kasid, U.N. & Cossman, J. (2000) Hodgkin disease: pharmacologic intervention of the CD40-NF kappa B pathway by a protease inhibitor. *Blood*, **96**, 2841-2848.
- Arnaout, R., Lee, W., Cahill, P., Honan, T., Sparrow, T., Weiland, M., Nusbaum, C., Rajewsky, K. & Koralov, S.B. (2011) High-resolution description of antibody heavy-chain repertoires in humans. *PLoS One*, **6**, e22365.
- Bachl, J., Carlson, C., Gray-Schopfer, V., Dessing, M. & Olsson, C. (2001) Increased transcription levels induce higher mutation rates in a hypermutating cell line. *J Immunol*, **166**, 5051-5057.
- Bargou, R.C., Emmerich, F., Krappmann, D., Bommert, K., Mapara, M.Y., Arnold, W., Royer, H.D., Grinstein, E., Greiner, A., Scheidereit, C. & Dorken, B. (1997) Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest*, **100**, 2961-2969.
- Basso, K. & Dalla-Favera, R. (2015) Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol*, **15**, 172-184.
- Bea, S., Valdes-Mas, R., Navarro, A., Salaverria, I., Martin-Garcia, D., Jares, P., Gine, E., Pinyol, M., Royo, C., Nadeu, F., Conde, L., Juan, M., Clot, G., Vizán, P., Di Croce, L., Puente, D.A., Lopez-Guerra, M., Moros, A., Roue, G., Aymerich, M., Villamor, N., Colomo, L., Martinez, A., Valera, A., Martin-Subero, J.I., Amador, V., Hernandez, L., Rozman, M., Enjuanes, A., Forcada, P., Muntanola, A., Hartmann, E.M., Calasanz, M.J., Rosenwald, A., Ott, G., Hernandez-Rivas, J.M., Klapper, W., Siebert, R., Wiestner, A., Wilson, W.H., Colomer, D., Lopez-Guillermo, A., Lopez-Otin, C., Puente, X.S. & Campo, E. (2013) Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 18250-18255.
- Bechtel, D., Kurth, J., Unkel, C. & Küppers, R. (2005) Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas. *Blood*, **106**, 4345-4350.
- Berek, C., Berger, A. & Apel, M. (1991) Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell*, **67**, 1121-1129.
- Bhatia, S., Yasui, Y., Robison, L.L., Birch, J.M., Bogue, M.K., Diller, L., DeLaat, C., Fossati-Bellani, F., Morgan, E., Oberlin, O., Reaman, G., Ruymann, F.B., Tersak, J., Meadows, A.T. & Late Effects Study, G. (2003) High risk of subsequent neoplasms continues with extended follow-up of childhood Hodgkin's disease: report from the Late Effects Study Group. *J Clin Oncol*, **21**, 4386-4394.
- Blackwell, T.K. & Alt, F.W. (1984) Site-specific recombination between immunoglobulin D and JH segments that were introduced into the genome of a murine pre-B cell line. *Cell*, **37**, 105-112.
- Boucher, L.M., Marengere, L.E., Lu, Y., Thukral, S. & Mak, T.W. (1997) Binding sites of cytoplasmic effectors TRAF1, 2, and 3 on CD30 and other members of the TNF receptor superfamily. *Biochem Biophys Res Commun*, **233**, 592-600.
- Bräuninger, A., Goossens, T., Rajewsky, K. & Küppers, R. (2001) Regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements during early B cell development in the human. *Eur J Immunol*, **31**, 3631-3637.

- Bräuninger, A., Hansmann, M.L., Strickler, J.G., Dummer, R., Burg, G., Rajewsky, K. & Küppers, R. (1999) Identification of common germinal-center B-cell precursors in two patients with both Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, **340**, 1239-1247.
- Bräuninger, A., Küppers, R., Strickler, J.G., Wacker, H.H., Rajewsky, K. & Hansmann, M.L. (1997) Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9337-9342.
- Bräuninger, A., Schmitz, R., Bechtel, D., Renne, C., Hansmann, M.L. & Küppers, R. (2006) Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer*, **118**, 1853-1861.
- Bräuninger, A., Wacker, H.H., Rajewsky, K., Küppers, R. & Hansmann, M.L. (2003) Typing the histogenetic origin of the tumor cells of lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma in relation to tumor cells of classical and lymphocyte-predominance Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res*, **63**, 1644-1651.
- Bullens, D.M., Rafiq, K., Charitidou, L., Peng, X., Kasran, A., Warmerdam, P.A., Van Gool, S.W. & Ceuppens, J.L. (2001) Effects of co-stimulation by CD58 on human T cell cytokine production: a selective cytokine pattern with induction of high IL-10 production. *Int Immunol*, **13**, 181-191.
- Cabannes, E., Khan, G., Aillet, F., Jarrett, R.F. & Hay, R.T. (1999) Mutations in the I κ B α gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I κ B α . *Oncogene*, **18**, 3063-3070.
- Calado, D.P., Sasaki, Y., Godinho, S.A., Pellerin, A., Kochert, K., Sleckman, B.P., de Alboran, I.M., Janz, M., Rodig, S. & Rajewsky, K. (2012) The cell-cycle regulator c-Myc is essential for the formation and maintenance of germinal centers. *Nat Immunol*, **13**, 1092-1100.
- Caleo, A., Sanchez-Aguilera, A., Rodriguez, S., Dotor, A.M., Beltran, L., de Larrinoa, A.F., Menarguez, F.J., Piris, M.A. & Garcia, J.F. (2003) Composite Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma: two clonally unrelated tumors. *Am J Surg Pathol*, **27**, 1577-1580.
- Camacho, E., Hernandez, L., Hernandez, S., Tort, F., Bellosillo, B., Bea, S., Bosch, F., Montserrat, E., Cardesa, A., Fernandez, P.L. & Campo, E. (2002) ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood*, **99**, 238-244.
- Carbone, A., Ghoghini, A., Gruss, H.J. & Pinto, A. (1995) CD40 ligand is constitutively expressed in a subset of T cell lymphomas and on the microenvironmental reactive T cells of follicular lymphomas and Hodgkin's disease. *Am J Pathol*, **147**, 912-922.
- Casellas, R., Shih, T.A., Kleinewietfeld, M., Rakonjac, J., Nemazee, D., Rajewsky, K. & Nussenzweig, M.C. (2001) Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science*, **291**, 1541-1544.
- Cattoretti, G. (2013) MYC expression and distribution in normal mature lymphoid cells. *J Pathol*, **229**, 430-440.
- Cattoretti, G., Buttner, M., Shaknovich, R., Kremmer, E., Alobeid, B. & Niedobitek, G. (2006) Nuclear and cytoplasmic AID in extrafollicular and germinal center B cells. *Blood*, **107**, 3967-3975.
- Cerutti, A., Schaffer, A., Shah, S., Zan, H., Liou, H.C., Goodwin, R.G. & Casali, P. (1998) CD30 is a CD40-inducible molecule that negatively regulates CD40-mediated immunoglobulin class switching in non-antigen-selected human B cells. *Immunity*, **9**, 247-256.
- Chaganti, S., Bell, A.I., Pastor, N.B., Milner, A.E., Drayson, M., Gordon, J. & Rickinson, A.B. (2005) Epstein-Barr virus infection in vitro can rescue germinal center B cells with inactivated immunoglobulin genes. *Blood*, **106**, 4249-4252.
- Challa-Malladi, M., Lieu, Y.K., Califano, O., Holmes, A.B., Bhagat, G., Murty, V.V., Dominguez-Sola, D., Pasqualucci, L. & Dalla-Favera, R. (2011) Combined genetic inactivation of beta2-Microglobulin and CD58 reveals frequent escape from immune recognition in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*, **20**, 728-740.
- Cowan, G., Weston-Bell, N.J., Bryant, D., Seckinger, A., Hose, D., Zojer, N. & Sahota, S.S. (2015) Massive parallel IGHV gene sequencing reveals a germinal center pathway in origins of human multiple myeloma. *Oncotarget*, **6**, 13229-13240.
- de Bourcy, C.F., De Vlaminc, I., Kanbar, J.N., Wang, J., Gawad, C. & Quake, S.R. (2014) A quantitative comparison of single-cell whole genome amplification methods. *PLoS One*, **9**, e105585.
- De Silva, N.S. & Klein, U. (2015) Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol*, **15**, 137-148.
- Dean, F.B., Hosono, S., Fang, L., Wu, X., Faruqi, A.F., Bray-Ward, P., Sun, Z., Zong, Q., Du, Y., Du, J., Driscoll, M., Song, W., Kingsmore, S.F., Egholm, M. & Lasken, R.S. (2002) Comprehensive

- human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 5261-5266.
- Delabie, J., Chan, W.C., Weisenburger, D.D. & De Wolf-Peeters, C. (1995) The antigen-presenting cell function of Reed-Sternberg cells. *Leuk Lymphoma*, **18**, 35-40.
- Di Noia, J.M. & Neuberger, M.S. (2007) Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem*, **76**, 1-22.
- Diehl, V., Thomas, R.K. & Re, D. (2004) Part II: Hodgkin's lymphoma--diagnosis and treatment. *Lancet Oncol*, **5**, 19-26.
- Dukers, D.F., van Galen, J.C., Giroth, C., Jansen, P., Sewalt, R.G., Otte, A.P., Kluin-Nelemans, H.C., Meijer, C.J. & Raaphorst, F.M. (2004) Unique polycomb gene expression pattern in Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's lymphoma-derived cell lines. *Am J Pathol*, **164**, 873-881.
- Dürkop, H., Latza, U., Hummel, M., Eitelbach, F., Seed, B. & Stein, H. (1992) Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell*, **68**, 421-427.
- Emmerich, F., Theurich, S., Hummel, M., Haeffker, A., Vry, M.S., Dohner, K., Bommert, K., Stein, H. & Dorken, B. (2003) Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *J Pathol*, **201**, 413-420.
- Falini, B., Pileri, S., Pizzolo, G., Durkop, H., Flenghi, L., Stirpe, F., Martelli, M.F. & Stein, H. (1995) CD30 (Ki-1) molecule: a new cytokine receptor of the tumor necrosis factor receptor superfamily as a tool for diagnosis and immunotherapy. *Blood*, **85**, 1-14.
- Feuerborn, A., Moritz, C., Von Bonin, F., Döbelstein, M., Trümper, L., Sturzenhofecker, B. & Kube, D. (2006) Dysfunctional p53 deletion mutants in cell lines derived from Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma*, **47**, 1932-1940.
- Fiumara, P., Snell, V., Li, Y., Mukhopadhyay, A., Younes, M., Gillenwater, A.M., Cabanillas, F., Aggarwal, B.B. & Younes, A. (2001) Functional expression of receptor activator of nuclear factor kappaB in Hodgkin disease cell lines. *Blood*, **98**, 2784-2790.
- Fromm, J.R., Kussick, S.J. & Wood, B.L. (2006) Identification and purification of classical Hodgkin cells from lymph nodes by flow cytometry and flow cytometric cell sorting. *Am J Clin Pathol*, **126**, 764-780.
- Giefing, M., Arneemann, J., Martin-Subero, J.I., Nieler, I., Bug, S., Hartmann, S., Arnold, N., Tacci, E., Frank, M., Hansmann, M.L., Küppers, R. & Siebert, R. (2008) Identification of candidate tumour suppressor gene loci for Hodgkin and Reed-Sternberg cells by characterisation of homozygous deletions in classical Hodgkin lymphoma cell lines. *Br J Haematol*, **142**, 916-924.
- Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D. & Hammerschmidt, W. (1997) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J*, **16**, 6131-6140.
- Gollob, J.A. & Ritz, J. (1996) CD2-CD58 interaction and the control of T-cell interleukin-12 responsiveness. Adhesion molecules link innate and acquired immunity. *Ann N Y Acad Sci*, **795**, 71-81.
- Goodnow, C.C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T.B., Smith-Gill, S.J., Brink, R.A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J.S., Loblay, R.H., Raphael, K. & et al. (1988) Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature*, **334**, 676-682.
- Goossens, T., Klein, U. & Küppers, R. (1998) Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2463-2468.
- Greiner, T.C., Moynihan, M.J., Chan, W.C., Lytle, D.M., Pedersen, A., Anderson, J.R. & Weisenburger, D.D. (1996) p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood*, **87**, 4302-4310.
- Grüss, H.J., Boiani, N., Williams, D.E., Armitage, R.J., Smith, C.A. & Goodwin, R.G. (1994) Pleiotropic effects of the CD30 ligand on CD30-expressing cells and lymphoma cell lines. *Blood*, **83**, 2045-2056.
- Gunawardana, J., Chan, F.C., Telenius, A., Woolcock, B., Kridel, R., Tan, K.L., Ben-Neriah, S., Mottok, A., Lim, R.S., Boyle, M., Rogic, S., Rimsza, L.M., Guiter, C., Leroy, K., Gaulard, P., Haioun, C., Marra, M.A., Savage, K.J., Connors, J.M., Shah, S.P., Gascoyne, R.D. & Steidl, C. (2014) Recurrent somatic mutations of PTPN1 in primary mediastinal B cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Nat Genet*, **46**, 329-335.
- Hayes, S.J., Banerjee, S.S., Cook, Y., Houghton, J.B. & Menasce, L.P. (2006) Composite mantle-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma. *Histopathology*, **48**, 621-623.
- Herbst, H., Foss, H.D., Samol, J., Araujo, I., Klotzbach, H., Krause, H., Agathangelou, A., Niedobitek, G. & Stein, H. (1996) Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. *Blood*, **87**, 2918-2929.

- Hernandez, L., Fest, T., Cazorla, M., Teruya-Feldstein, J., Bosch, F., Peinado, M.A., Piris, M.A., Montserrat, E., Cardesa, A., Jaffe, E.S., Campo, E. & Raffeld, M. (1996) p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood*, **87**, 3351-3359.
- Hinz, M., Lemke, P., Anagnostopoulos, I., Hacker, C., Krappmann, D., Mathas, S., Dorken, B., Zenke, M., Stein, H. & Scheidereit, C. (2002) Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J Exp Med*, **196**, 605-617.
- Honjo, T. (1982) The molecular mechanisms of the immunoglobulin class switch. *Immunol Today*, **3**, 214-217.
- Honma, K., Tsuzuki, S., Nakagawa, M., Tagawa, H., Nakamura, S., Morishima, Y. & Seto, M. (2009) TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Blood*, **114**, 2467-2475.
- Horie, R., Aizawa, S., Nagai, M., Ito, K., Higashihara, M., Ishida, T., Inoue, J. & Watanabe, T. (1998) A novel domain in the CD30 cytoplasmic tail mediates NFkappaB activation. *Int Immunol*, **10**, 203-210.
- Horie, R. & Watanabe, T. (1998) CD30: expression and function in health and disease. *Semin Immunol*, **10**, 457-470.
- Horie, R., Watanabe, T., Morishita, Y., Ito, K., Ishida, T., Kanegae, Y., Saito, I., Higashihara, M., Mori, S., Kadin, M.E. & Watanabe, T. (2002) Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF-kappaB activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Oncogene*, **21**, 2493-2503.
- Hu, S., Xu-Monette, Z.Y., Balasubramanyam, A., Manyam, G.C., Visco, C., Tzankov, A., Liu, W.M., Miranda, R.N., Zhang, L., Montes-Moreno, S., Dybkaer, K., Chiu, A., Orazi, A., Zu, Y., Bhagat, G., Richards, K.L., Hsi, E.D., Choi, W.W., Han van Krieken, J., Huang, Q., Huh, J., Ai, W., Ponzoni, M., Ferreri, A.J., Zhao, X., Winter, J.N., Zhang, M., Li, L., Moller, M.B., Piris, M.A., Li, Y., Go, R.S., Wu, L., Medeiros, L.J. & Young, K.H. (2013) CD30 expression defines a novel subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*, **121**, 2715-2724.
- Hummel, M., Marafioti, T., Ziemann, K. & Stein, H. (1996) Ig rearrangements in isolated Reed-Sternberg cells: conclusions from four different studies. *Ann Oncol*, **7 Suppl 4**, 31-33.
- Iellem, A., Mariani, M., Lang, R., Recalde, H., Panina-Bordignon, P., Sinigaglia, F. & D'Ambrosio, D. (2001) Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med*, **194**, 847-853.
- Imai, T., Nagira, M., Takagi, S., Kakizaki, M., Nishimura, M., Wang, J., Gray, P.W., Matsushima, K. & Yoshie, O. (1999) Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol*, **11**, 81-88.
- Irsch, J., Nitsch, S., Hansmann, M.L., Rajewsky, K., Tesch, H., Diehl, V., Jox, A., Küppers, R. & Radbruch, A. (1998) Isolation of viable Hodgkin and Reed-Sternberg cells from Hodgkin disease tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10117-10122.
- Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K. & Weiss, U. (1991) Intracloal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature*, **354**, 389-392.
- Jaffe, E.S., Zarate-Osorno, A., Kingma, D.W., Raffeld, M. & Medeiros, L.J. (1994) The interrelationship between Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphomas. *Ann Oncol*, **5 Suppl 1**, 7-11.
- Jares, P. & Campo, E. (2008) Advances in the understanding of mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*, **142**, 149-165.
- Joos, S., Menz, C.K., Wrobel, G., Siebert, R., Gesk, S., Ohi, S., Mechttersheimer, G., Trumper, L., Moller, P., Lichter, P. & Barth, T.F. (2002) Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. *Blood*, **99**, 1381-1387.
- Jundt, F., Acikgoz, O., Kwon, S.H., Schwarzer, R., Anagnostopoulos, I., Wiesner, B., Mathas, S., Hummel, M., Stein, H., Reichardt, H.M. & Dorken, B. (2008) Aberrant expression of Notch1 interferes with the B-lymphoid phenotype of neoplastic B cells in classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia*, **22**, 1587-1594.
- Jundt, F., Kley, K., Anagnostopoulos, I., Schulze Probsting, K., Greiner, A., Mathas, S., Scheidereit, C., Wirth, T., Stein, H. & Dorken, B. (2002) Loss of PU.1 expression is associated with defective immunoglobulin transcription in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease. *Blood*, **99**, 3060-3062.
- Jungnickel, B., Staratschek-Jox, A., Bräuninger, A., Spieker, T., Wolf, J., Diehl, V., Hansmann, M.L., Rajewsky, K. & Küppers, R. (2000) Clonal deleterious mutations in the IkappaBalpha gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *J Exp Med*, **191**, 395-402.

- Kadin, M.E., Agnarsson, B.A., Ellingsworth, L.R. & Newcom, S.R. (1990) Immunohistochemical evidence of a role for transforming growth factor beta in the pathogenesis of nodular sclerosing Hodgkin's disease. *Am J Pathol*, **136**, 1209-1214.
- Kamesaki, H., Fukuhara, S., Tatsumi, E., Uchino, H., Yamabe, H., Miwa, H., Shirakawa, S., Hatanaka, M. & Honjo, T. (1986) Cytochemical, immunologic, chromosomal, and molecular genetic analysis of a novel cell line derived from Hodgkin's disease. *Blood*, **68**, 285-292.
- Kanzler, H., Hansmann, M.L., Kapp, U., Wolf, J., Diehl, V., Rajewsky, K. & Küppers, R. (1996a) Molecular single cell analysis demonstrates the derivation of a peripheral blood-derived cell line (L1236) from the Hodgkin/Reed-Sternberg cells of a Hodgkin's lymphoma patient. *Blood*, **87**, 3429-3436.
- Kanzler, H., Küppers, R., Hansmann, M.L. & Rajewsky, K. (1996b) Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med*, **184**, 1495-1505.
- Kato, M., Sanada, M., Kato, I., Sato, Y., Takita, J., Takeuchi, K., Niwa, A., Chen, Y., Nakazaki, K., Nomoto, J., Asakura, Y., Muto, S., Tamura, A., Iio, M., Akatsuka, Y., Hayashi, Y., Mori, H., Igarashi, T., Kurokawa, M., Chiba, S., Mori, S., Ishikawa, Y., Okamoto, K., Tobinai, K., Nakagama, H., Nakahata, T., Yoshino, T., Kobayashi, Y. & Ogawa, S. (2009) Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature*, **459**, 712-716.
- Kieser, A., Kilger, E., Gires, O., Ueffing, M., Kolch, W. & Hammerschmidt, W. (1997) Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. *EMBO J*, **16**, 6478-6485.
- Kim, H., Hendrickson, R. & Dorfman, R.F. (1977) Composite lymphoma. *Cancer*, **40**, 959-976.
- Kitano, M., Moriyama, S., Ando, Y., Hikida, M., Mori, Y., Kurosaki, T. & Okada, T. (2011) Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity*, **34**, 961-972.
- Klein, U., Goossens, T., Fischer, M., Kanzler, H., Bräuninger, A., Rajewsky, K. & Küppers, R. (1998a) Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol Rev*, **162**, 261-280.
- Klein, U., Rajewsky, K. & Küppers, R. (1998b) Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med*, **188**, 1679-1689.
- Kocks, C. & Rajewsky, K. (1989) Stable expression and somatic hypermutation of antibody V regions in B-cell developmental pathways. *Annu Rev Immunol*, **7**, 537-559.
- Krebs, D.L. & Hilton, D.J. (2001) SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells*, **19**, 378-387.
- Kridel, R., Meissner, B., Rogic, S., Boyle, M., Telenius, A., Woolcock, B., Gunawardana, J., Jenkins, C., Cochrane, C., Ben-Neriah, S., Tan, K., Morin, R.D., Opat, S., Sehn, L.H., Connors, J.M., Marra, M.A., Weng, A.P., Steidl, C. & Gascoyne, R.D. (2012) Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma. *Blood*, **119**, 1963-1971.
- Kroese, F.G., Timens, W. & Nieuwenhuis, P. (1990) Germinal center reaction and B lymphocytes: morphology and function. *Curr Top Pathol*, **84 (Pt 1)**, 103-148.
- Kube, D., Holtick, U., Vockerodt, M., Ahmadi, T., Haier, B., Behrmann, I., Heinrich, P.C., Diehl, V. & Tesch, H. (2001) STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood*, **98**, 762-770.
- Küppers, R. (2005) Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*, **5**, 251-262.
- Küppers, R. (2009) The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer*, **9**, 15-27.
- Küppers, R. (2012) New insights in the biology of Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, **2012**, 328-334.
- Küppers, R., Dührsen, U. & Hansmann, M.L. (2014) Pathogenesis, diagnosis, and treatment of composite lymphomas. *Lancet Oncol*, **15**, e435-446.
- Küppers, R., Engert, A. & Hansmann, M.L. (2012) Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest*, **122**, 3439-3447.
- Küppers, R., Hansmann, M.L. & Rajewsky, K. (1998) Clonality and germinal centre B-cell derivation of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Ann Oncol*, **9 Suppl 5**, S17-20.
- Küppers, R., Klein, U., Hansmann, M.L. & Rajewsky, K. (1999) Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med*, **341**, 1520-1529.
- Küppers, R., Rajewsky, K., Zhao, M., Simons, G., Laumann, R., Fischer, R. & Hansmann, M.L. (1994) Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 10962-10966.
- Küppers, R., Schneider, M. & Hansmann, M.L. (2013) Laser-based microdissection of single cells from tissue sections and PCR analysis of rearranged immunoglobulin genes from isolated normal and malignant human B cells. *Methods Mol Biol*, **971**, 49-63.

- Küppers, R., Sousa, A.B., Baur, A.S., Strickler, J.G., Rajewsky, K. & Hansmann, M.L. (2001) Common germinal-center B-cell origin of the malignant cells in two composite lymphomas, involving classical Hodgkin's disease and either follicular lymphoma or B-CLL. *Mol Med*, **7**, 285-292.
- Küppers, R., Zhao, M., Hansmann, M.L. & Rajewsky, K. (1993) Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J*, **12**, 4955-4967.
- Kurth, J., Spieker, T., Wustrow, J., Strickler, G.J., Hansmann, L.M., Rajewsky, K. & Küppers, R. (2000) EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency. *Immunity*, **13**, 485-495.
- Lake, A., Shield, L.A., Cordano, P., Chui, D.T., Osborne, J., Crae, S., Wilson, K.S., Tosi, S., Knight, S.J., Gesk, S., Siebert, R., Hay, R.T. & Jarrett, R.F. (2009) Mutations of NFKBIA, encoding IkappaB alpha, are a recurrent finding in classical Hodgkin lymphoma but are not a unifying feature of non-EBV-associated cases. *Int J Cancer*, **125**, 1334-1342.
- Lamprecht, B., Kreher, S., Anagnostopoulos, I., Johrens, K., Monteleone, G., Jundt, F., Stein, H., Janz, M., Dorken, B. & Mathas, S. (2008) Aberrant expression of the Th2 cytokine IL-21 in Hodgkin lymphoma cells regulates STAT3 signaling and attracts Treg cells via regulation of MIP-3alpha. *Blood*, **112**, 3339-3347.
- Lebecque, S.G. & Gearhart, P.J. (1990) Boundaries of somatic mutation in rearranged immunoglobulin genes: 5' boundary is near the promoter, and 3' boundary is approximately 1 kb from V(D)J gene. *J Exp Med*, **172**, 1717-1727.
- Lee, S.Y., Lee, S.Y., Kandala, G., Liou, M.L., Liou, H.C. & Choi, Y. (1996) CD30/TNF receptor-associated factor interaction: NF-kappa B activation and binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 9699-9703.
- Lin, C.Y., Loven, J., Rahl, P.B., Paranal, R.M., Burge, C.B., Bradner, J.E., Lee, T.I. & Young, R.A. (2012) Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell*, **151**, 56-67.
- Lin, L., Nonoyama, S., Oshiba, A., Kabasawa, Y. & Mizutani, S. (2003) TARC and MDC are produced by CD40 activated human B cells and are elevated in the sera of infantile atopic dermatitis patients. *J Med Dent Sci*, **50**, 27-33.
- Liu, X., Yu, H., Yang, W., Zhou, X., Lu, H. & Shi, D. (2010) Mutations of NFKBIA in biopsy specimens from Hodgkin lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet*, **197**, 152-157.
- Liu, Y., Abdul Razak, F.R., Terpstra, M., Chan, F.C., Saber, A., Nijland, M., van Imhoff, G., Visser, L., Gascoyne, R., Steidl, C., Kluiver, J., Diepstra, A., Kok, K. & van den Berg, A. (2014) The mutational landscape of Hodgkin lymphoma cell lines determined by whole-exome sequencing. *Leukemia*, **28**, 2248-2251.
- Liu, Y.J., de Bouteiller, O., Arpin, C., Briere, F., Galibert, L., Ho, S., Martinez-Valdez, H., Banchereau, J. & Lebecque, S. (1996) Normal human IgD+IgM- germinal center B cells can express up to 80 mutations in the variable region of their IgD transcripts. *Immunity*, **4**, 603-613.
- Mader, A., Bruderlein, S., Wegener, S., Melzner, I., Popov, S., Muller-Hermelink, H.K., Barth, T.F., Viardot, A. & Moller, P. (2007) U-HO1, a new cell line derived from a primary refractory classical Hodgkin lymphoma. *Cytogenet Genome Res*, **119**, 204-210.
- Maggio, E.M., Stekelenburg, E., Van den Berg, A. & Poppema, S. (2001) TP53 gene mutations in Hodgkin lymphoma are infrequent and not associated with absence of Epstein-Barr virus. *Int J Cancer*, **94**, 60-66.
- Mancao, C., Altmann, M., Jungnickel, B. & Hammerschmidt, W. (2005) Rescue of "crippled" germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus. *Blood*, **106**, 4339-4344.
- Mancao, C. & Hammerschmidt, W. (2007) Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. *Blood*, **110**, 3715-3721.
- Manis, J.P., Tian, M. & Alt, F.W. (2002) Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol*, **23**, 31-39.
- Marafioti, T., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Foss, H.D., Falini, B., Delsol, G., Isaacson, P.G., Pileri, S. & Stein, H. (1997) Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells. *N Engl J Med*, **337**, 453-458.
- Marafioti, T., Hummel, M., Foss, H.D., Laumen, H., Korbjuhn, P., Anagnostopoulos, I., Lammert, H., Demel, G., Theil, J., Wirth, T. & Stein, H. (2000) Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood*, **95**, 1443-1450.
- Martin-Subero, J.I., Gesk, S., Harder, L., Sonoki, T., Tucker, P.W., Schlegelberger, B., Grote, W., Novo, F.J., Calasanz, M.J., Hansmann, M.L., Dyer, M.J. & Siebert, R. (2002) Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, **99**, 1474-1477.

- Martin-Subero, J.I., Wlodarska, I., Bastard, C., Picquenot, J.M., Hoppner, J., Giefing, M., Klapper, W. & Siebert, R. (2006) Chromosomal rearrangements involving the BCL3 locus are recurrent in classical Hodgkin and peripheral T-cell lymphoma. *Blood*, **108**, 401-402; author reply 402-403.
- Mathas, S., Janz, M., Hummel, F., Hummel, M., Wollert-Wulf, B., Lusatis, S., Anagnostopoulos, I., Lietz, A., Sigvardsson, M., Jundt, F., Johrens, K., Bommert, K., Stein, H. & Dorken, B. (2006) Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma. *Nat Immunol*, **7**, 207-215.
- Matsuki, E. & Younes, A. (2015) Lymphomagenesis in Hodgkin lymphoma. *Semin Cancer Biol*.
- McBlane, J.F., van Gent, D.C., Ramsden, D.A., Romeo, C., Cuomo, C.A., Gellert, M. & Oettinger, M.A. (1995) Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell*, **83**, 387-395.
- Meffre, E., Casellas, R. & Nussenzweig, M.C. (2000) Antibody regulation of B cell development. *Nat Immunol*, **1**, 379-385.
- Melchers, F., Rolink, A., Grawunder, U., Winkler, T.H., Karasuyama, H., Ghia, P. & Andersson, J. (1995) Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol*, **7**, 214-227.
- Mir, S.S., Richter, B.W. & Duckett, C.S. (2000) Differential effects of CD30 activation in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin disease cells. *Blood*, **96**, 4307-4312.
- Montesinos-Rongen, M., Roers, A., Küppers, R., Rajewsky, K. & Hansmann, M.L. (1999) Mutation of the p53 gene is not a typical feature of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Blood*, **94**, 1755-1760.
- Mozos, A., Royo, C., Hartmann, E., De Jong, D., Baro, C., Valera, A., Fu, K., Weisenburger, D.D., Delabie, J., Chuang, S.S., Jaffe, E.S., Ruiz-Marcellan, C., Dave, S., Rimsza, L., Braziel, R., Gascoyne, R.D., Sole, F., Lopez-Guillermo, A., Colomer, D., Staudt, L.M., Rosenwald, A., Ott, G., Jares, P. & Campo, E. (2009) SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica*, **94**, 1555-1562.
- Müller, C., Siemer, D., Lehnerdt, G., Lang, S. & Küppers, R. (2010) Molecular analysis of IgD-positive human germinal centres. *Int Immunol*, **22**, 289-298.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y. & Honjo, T. (2000) Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, **102**, 553-563.
- Murphy, K.M., Travers, P., und Walport, M. (2008) *Janeway's Immunology*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, New York, Abingdon.
- Muschen, M., Rajewsky, K., Bräuninger, A., Baur, A.S., Oudejans, J.J., Roers, A., Hansmann, M.L. & Küppers, R. (2000a) Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. *J Exp Med*, **191**, 387-394.
- Muschen, M., Re, D., Bräuninger, A., Wolf, J., Hansmann, M.L., Diehl, V., Küppers, R. & Rajewsky, K. (2000c) Somatic mutations of the CD95 gene in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Cancer Res*, **60**, 5640-5643.
- Nakamura, N., Ohshima, K., Abe, M. & Osamura, Y. (2007) Demonstration of chimeric DNA of bcl-2 and immunoglobulin heavy chain in follicular lymphoma and subsequent Hodgkin lymphoma from the same patient. *J Clin Exp Hematop*, **47**, 9-13.
- Naumovski, L., Utz, P.J., Bergstrom, S.K., Morgan, R., Molina, A., Toole, J.J., Glader, B.E., McFall, P., Weiss, L.M., Warnke, R. & et al. (1989) SUP-HD1: a new Hodgkin's disease-derived cell line with lymphoid features produces interferon-gamma. *Blood*, **74**, 2733-2742.
- Ng, A.K., Bernardo, M.P., Weller, E., Backstrand, K.H., Silver, B., Marcus, K.C., Tarbell, N.J., Friedberg, J., Canellos, G.P. & Mauch, P.M. (2002) Long-term survival and competing causes of death in patients with early-stage Hodgkin's disease treated at age 50 or younger. *J Clin Oncol*, **20**, 2101-2108.
- Nie, Z., Hu, G., Wei, G., Cui, K., Yamane, A., Resch, W., Wang, R., Green, D.R., Tessarollo, L., Casellas, R., Zhao, K. & Levens, D. (2012) c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell*, **151**, 68-79.
- Nozawa, Y., Wakasa, H. & Abe, M. (1998) Costimulatory molecules (CD80 and CD86) on Reed-Sternberg cells are associated with the proliferation of background T cells in Hodgkin's disease. *Pathol Int*, **48**, 10-14.
- Otto, C., Giefing, M., Massow, A., Vater, I., Gesk, S., Schlesner, M., Richter, J., Klapper, W., Hansmann, M.L., Siebert, R. & Küppers, R. (2012) Genetic lesions of the TRAF3 and MAP3K14 genes in classical Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*, **157**, 702-708.
- Palomero, T., Couronne, L., Khiabani, H., Kim, M.Y., Ambesi-Impimbato, A., Perez-Garcia, A., Carpenter, Z., Abate, F., Allegretta, M., Haydu, J.E., Jiang, X., Lossos, I.S., Nicolas, C., Balbin, M., Bastard, C., Bhagat, G., Piris, M.A., Campo, E., Bernard, O.A., Rabadan, R. &

- Ferrando, A.A. (2014) Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat Genet*, **46**, 166-170.
- Pascual, V., Liu, Y.J., Magalski, A., de Bouteiller, O., Banchereau, J. & Capra, J.D. (1994) Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med*, **180**, 329-339.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti, R.S., Klein, U., Küppers, R., Rajewsky, K. & Dalla-Favera, R. (1998) BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11816-11821.
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R.S., Küppers, R. & Dalla-Favera, R. (2001) Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*, **412**, 341-346.
- Pereira, J.P., Kelly, L.M., Xu, Y. & Cyster, J.G. (2009) EBI2 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. *Nature*, **460**, 1122-1126.
- Perez-Galan, P., Dreyling, M. & Wiestner, A. (2011) Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood*, **117**, 26-38.
- Philipp, C., Edelmann, J., Buhler, A., Winkler, D., Stilgenbauer, S. & Küppers, R. (2011) Mutation analysis of the TNFAIP3 (A20) tumor suppressor gene in CLL. *Int J Cancer*, **128**, 1747-1750.
- Przekopowicz, M., Küppers, R. & Weniger, M.A. (2015) A large fraction of human tonsillar B cells expressing CD27 are germinal center B cells. *Immunol Cell Biol*, **93**, 429-430.
- Raaphorst, F.M., van Kemenade, F.J., Blokzijl, T., Fieret, E., Hamer, K.M., Satijn, D.P., Otte, A.P. & Meijer, C.J. (2000) Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb group genes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Am J Pathol*, **157**, 709-715.
- Rajewsky, K. (1996) Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, **381**, 751-758.
- Reichel, J., Chadburn, A., Rubinstein, P.G., Giulino-Roth, L., Tam, W., Liu, Y., Gaiolla, R., Eng, K., Brody, J., Inghirami, G., Carlo-Stella, C., Santoro, A., Rahal, D., Totonchy, J., Elemento, O., Cesarman, E. & Roshal, M. (2015) Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood*, **125**, 1061-1072.
- Renne, C., Martin-Subero, J.I., Eickernjager, M., Hansmann, M.L., Küppers, R., Siebert, R. & Bräuninger, A. (2006) Aberrant expression of ID2, a suppressor of B-cell-specific gene expression, in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol*, **169**, 655-664.
- Retter, M.W. & Nemazee, D. (1998) Receptor editing occurs frequently during normal B cell development. *J Exp Med*, **188**, 1231-1238.
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Lapelouse, R., Gennery, A., Tezcan, I., Ersoy, F., Kayserili, H., Ugazio, A.G., Brousse, N., Muramatsu, M., Notarangelo, L.D., Kinoshita, K., Honjo, T., Fischer, A. & Durandy, A. (2000) Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell*, **102**, 565-575.
- Rogozin, I.B. & Kolchanov, N.A. (1992) Somatic hypermutagenesis in immunoglobulin genes. II. Influence of neighbouring base sequences on mutagenesis. *Biochim Biophys Acta*, **1171**, 11-18.
- Rosenquist, R., Menestrina, F., Lestani, M., Küppers, R., Hansmann, M.L. & Bräuninger, A. (2004a) Indications for peripheral light-chain revision and somatic hypermutation without a functional B-cell receptor in precursors of a composite diffuse large B-cell and Hodgkin's lymphoma. *Lab Invest*, **84**, 253-262.
- Rosenquist, R., Roos, G., Erlanson, M., Küppers, R., Bräuninger, A. & Hansmann, M.L. (2004c) Clonally related splenic marginal zone lymphoma and Hodgkin lymphoma with unmutated V gene rearrangements and a 15-yr time gap between diagnoses. *Eur J Haematol*, **73**, 210-214.
- Rothe, A., Sasse, S., Goergen, H., Eichenauer, D.A., Lohri, A., Jager, U., Bangard, C., Boll, B., von Bergwelt-Baildon, M., Theurich, S., Borchmann, P. & Engert, A. (2012) Brentuximab vedotin for relapsed or refractory CD30+ hematologic malignancies: the German Hodgkin Study Group experience. *Blood*, **120**, 1470-1472.
- Saitoh, Y., Yamamoto, N., Dewan, M.Z., Sugimoto, H., Martinez Bruyn, V.J., Iwasaki, Y., Matsubara, K., Qi, X., Saitoh, T., Imoto, I., Inazawa, J., Utsunomiya, A., Watanabe, T., Masuda, T., Yamamoto, N. & Yamaoka, S. (2008) Overexpressed NF-kappaB-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood*, **111**, 5118-5129.
- Sanders, M.E., Makgoba, M.W., Sussman, E.H., Luce, G.E., Cossman, J. & Shaw, S. (1988) Molecular pathways of adhesion in spontaneous rosetting of T-lymphocytes to the Hodgkin's cell line L428. *Cancer Res*, **48**, 37-40.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.

- Sanz, I. (1991) Multiple mechanisms participate in the generation of diversity of human H chain CDR3 regions. *J Immunol*, **147**, 1720-1729.
- Scheeren, F.A., Diehl, S.A., Smit, L.A., Beaumont, T., Naspetti, M., Bende, R.J., Blom, B., Karube, K., Ohshima, K., van Noesel, C.J. & Spits, H. (2008) IL-21 is expressed in Hodgkin lymphoma and activates STAT5: evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis. *Blood*, **111**, 4706-4715.
- Schmidt, A., Schmitz, R., Giefing, M., Martin-Subero, J.I., Gesk, S., Vater, I., Massow, A., Maggio, E., Schneider, M., Hansmann, M.L., Siebert, R. & Küppers, R. (2010) Rare occurrence of biallelic CYLD gene mutations in classical Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, **49**, 803-809.
- Schmitz, R., Hansmann, M.L., Bohle, V., Martin-Subero, J.I., Hartmann, S., Mechttersheimer, G., Klapper, W., Vater, I., Giefing, M., Gesk, S., Stanelle, J., Siebert, R. & Küppers, R. (2009) TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp Med*, **206**, 981-989.
- Schmitz, R., Renne, C., Rosenquist, R., Tinguely, M., Distler, V., Menestrina, F., Lestani, M., Stankovic, T., Austen, B., Bräuninger, A., Hansmann, M.L. & Küppers, R. (2005) Insights into the multistep transformation process of lymphomas: IgH-associated translocations and tumor suppressor gene mutations in clonally related composite Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia*, **19**, 1452-1458.
- Schneider, C. & Hubinger, G. (2002) Pleiotropic signal transduction mediated by human CD30: a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family. *Leuk Lymphoma*, **43**, 1355-1366.
- Schneider, S., Crescenzi, B., Schneider, M., Ascani, S., Hartmann, S., Hansmann, M.L., Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E. & Küppers, R. (2014) Subclonal evolution of a classical Hodgkin lymphoma from a germinal center B-cell-derived mantle cell lymphoma. *Int J Cancer*, **134**, 832-843.
- Schwarzer, R., Dorken, B. & Jundt, F. (2012) Notch is an essential upstream regulator of NF-kappaB and is relevant for survival of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Leukemia*, **26**, 806-813.
- Schwering, I., Bräuninger, A., Klein, U., Jungnickel, B., Tinguely, M., Diehl, V., Hansmann, M.L., Dalla-Favera, R., Rajewsky, K. & Küppers, R. (2003) Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, **101**, 1505-1512.
- Seifert, M., Steimle-Grauer, S.A., Goossens, T., Hansmann, M.L., Bräuninger, A. & Küppers, R. (2009) A model for the development of human IgD-only B cells: Genotypic analyses suggest their generation in superantigen driven immune responses. *Mol Immunol*, **46**, 630-639.
- Seitz, V., Hummel, M., Marafioti, T., Anagnostopoulos, I., Assaf, C. & Stein, H. (2000) Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. *Blood*, **95**, 3020-3024.
- Shaffer, A.L., Lin, K.I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltane, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K. & Staudt, L.M. (2002) Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity*, **17**, 51-62.
- Shanebeck, K.D., Maliszewski, C.R., Kennedy, M.K., Picha, K.S., Smith, C.A., Goodwin, R.G. & Grabstein, K.H. (1995) Regulation of murine B cell growth and differentiation by CD30 ligand. *Eur J Immunol*, **25**, 2147-2153.
- Skinninger, B.F., Elia, A.J., Gascoyne, R.D., Patterson, B., Trumper, L., Kapp, U. & Mak, T.W. (2002) Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, **99**, 618-626.
- Skinninger, B.F. & Mak, T.W. (2002) The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, **99**, 4283-4297.
- Sotomayor, E.M., Young, K.H. & Younes, A. (2014) Clinical roundtable monograph: CD30 in lymphoma: its role in biology, diagnostic testing, and targeted therapy. *Clin Adv Hematol Oncol*, **12**, 1-22.
- Springer, T.A., Dustin, M.L., Kishimoto, T.K. & Marlin, S.D. (1987) The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Annu Rev Immunol*, **5**, 223-252.
- Stamatopoulos, K., Kosmas, C., Belessi, C., Kyriazopoulos, P., Papadaki, T., Anagnostou, D. & Loukopoulos, D. (1999) Molecular analysis of bcl-1/IgH junctional sequences in mantle cell lymphoma: potential mechanism of the t(11;14) chromosomal translocation. *Br J Haematol*, **105**, 190-197.
- Stanelle, J., Doring, C., Hansmann, M.L. & Küppers, R. (2010) Mechanisms of aberrant GATA3 expression in classical Hodgkin lymphoma and its consequences for the cytokine profile of Hodgkin and Reed/Sternberg cells. *Blood*, **116**, 4202-4211.
- Stathis, A. & Younes, A. (2015) The new therapeutical scenario of Hodgkin lymphoma. *Ann Oncol*.

- Steidl, C., Connors, J.M. & Gascoyne, R.D. (2011) Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma: increasing evidence of the importance of the microenvironment. *J Clin Oncol*, **29**, 1812-1826.
- Steidl, C., Telenius, A., Shah, S.P., Farinha, P., Barclay, L., Boyle, M., Connors, J.M., Horsman, D.E. & Gascoyne, R.D. (2010) Genome-wide copy number analysis of Hodgkin Reed-Sternberg cells identifies recurrent imbalances with correlations to treatment outcome. *Blood*, **116**, 418-427.
- Stein, H., Marafioti, T., Foss, H.D., Laumen, H., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Wirth, T., Demel, G. & Falini, B. (2001) Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. *Blood*, **97**, 496-501.
- Stein, H., Mason, D.Y., Gerdes, J., O'Connor, N., Wainscoat, J., Pallesen, G., Gatter, K., Falini, B., Delsol, G., Lemke, H. & et al. (1985) The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood*, **66**, 848-858.
- Takemori, T., Kaji, T., Takahashi, Y., Shimoda, M. & Rajewsky, K. (2014) Generation of memory B cells inside and outside germinal centers. *Eur J Immunol*, **44**, 1258-1264.
- Tinguely, M., Rosenquist, R., Sundstrom, C., Amini, R.M., Küppers, R., Hansmann, M.L. & Bräuninger, A. (2003) Analysis of a clonally related mantle cell and Hodgkin lymphoma indicates Epstein-Barr virus infection of a Hodgkin/Reed-Sternberg cell precursor in a germinal center. *Am J Surg Pathol*, **27**, 1483-1488.
- Tonegawa, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, **302**, 575-581.
- Torlakovic, E., Tierens, A., Dang, H.D. & Delabie, J. (2001) The transcription factor PU.1, necessary for B-cell development is expressed in lymphocyte predominance, but not classical Hodgkin's disease. *Am J Pathol*, **159**, 1807-1814.
- Tsitsikov, E.N., Wright, D.A. & Geha, R.S. (1997) CD30 induction of human immunodeficiency virus gene transcription is mediated by TRAF2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1390-1395.
- Ushmorov, A., Ritz, O., Hummel, M., Leithauser, F., Moller, P., Stein, H. & Wirth, T. (2004) Epigenetic silencing of the immunoglobulin heavy-chain gene in classical Hodgkin lymphoma-derived cell lines contributes to the loss of immunoglobulin expression. *Blood*, **104**, 3326-3334.
- van den Berg, A., Maggio, E., Rust, R., Kooistra, K., Diepstra, A. & Poppema, S. (2002) Clonal relation in a case of CLL, ALCL, and Hodgkin composite lymphoma. *Blood*, **100**, 1425-1429.
- Verbeke, C.S., Wenthe, U., Grobholz, R. & Zentgraf, H. (2001) Fas ligand expression in Hodgkin lymphoma. *Am J Surg Pathol*, **25**, 388-394.
- Victoria, G.D. & Nussenzweig, M.C. (2012) Germinal centers. *Annu Rev Immunol*, **30**, 429-457.
- Victoria, G.D., Schwickert, T.A., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M.L. & Nussenzweig, M.C. (2010) Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell*, **143**, 592-605.
- Vockerodt, M., Soares, M., Kanzler, H., Küppers, R., Kube, D., Hansmann, M.L., Diehl, V. & Tesch, H. (1998) Detection of clonal Hodgkin and Reed-Sternberg cells with identical somatically mutated and rearranged VH genes in different biopsies in relapsed Hodgkin's disease. *Blood*, **92**, 2899-2907.
- Wagner, S.D. & Neuberger, M.S. (1996) Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol*, **14**, 441-457.
- Wang, J.H., Smolyar, A., Tan, K., Liu, J.H., Kim, M., Sun, Z.Y., Wagner, G. & Reinherz, E.L. (1999) Structure of a heterophilic adhesion complex between the human CD2 and CD58 (LFA-3) counterreceptors. *Cell*, **97**, 791-803.
- Weill, J.C., Weller, S. & Reynaud, C.A. (2009) Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol*, **27**, 267-285.
- Weiss, L.M., Movahed, L.A., Warnke, R.A. & Sklar, J. (1989) Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med*, **320**, 502-506.
- Weniger, M.A., Melzner, I., Menz, C.K., Wegener, S., Bucur, A.J., Dorsch, K., Mattfeldt, T., Barth, T.F. & Moller, P. (2006) Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene*, **25**, 2679-2684.
- Wertz, I.E., O'Rourke, K.M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D.L., Ma, A., Koonin, E.V. & Dixit, V.M. (2004) De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*, **430**, 694-699.
- Wu, Y.C., Kipling, D. & Dunn-Walters, D.K. (2011) The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood. *Front Immunol*, **2**, 81.
- Yamamoto, R., Nishikori, M., Kitawaki, T., Sakai, T., Hishizawa, M., Tashima, M., Kondo, T., Ohmori, K., Kurata, M., Hayashi, T. & Uchiyama, T. (2008) PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood*, **111**, 3220-3224.

- Ye, B.H., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Hawe, N., de Waard, R., Leung, C., Nouri-Shirazi, M., Orazi, A., Chaganti, R.S., Rothman, P., Stall, A.M., Pandolfi, P.P. & Dalla-Favera, R. (1997) The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet*, **16**, 161-170.
- Yoshida, T., Mei, H., Dorner, T., Hiepe, F., Radbruch, A., Fillatreau, S. & Hoyer, B.F. (2010) Memory B and memory plasma cells. *Immunol Rev*, **237**, 117-139.
- Younes, A., Bartlett, N.L., Leonard, J.P., Kennedy, D.A., Lynch, C.M., Sievers, E.L. & Forero-Torres, A. (2010) Brentuximab vedotin (SGN-35) for relapsed CD30-positive lymphomas. *N Engl J Med*, **363**, 1812-1821.
- Younes, A., Connors, J.M., Park, S.I., Fanale, M., O'Meara, M.M., Hunder, N.N., Huebner, D. & Ansell, S.M. (2013) Brentuximab vedotin combined with ABVD or AVD for patients with newly diagnosed Hodgkin's lymphoma: a phase 1, open-label, dose-escalation study. *Lancet Oncol*, **14**, 1348-1356.
- Yung, L. & Linch, D. (2003) Hodgkin's lymphoma. *Lancet*, **361**, 943-951.

7 Anhang

7.1 Publikationen

Stefanie Schneider, Barbara Crescenzi, Markus Schneider, Stefano Ascani, Sylvia Hartmann, Martin-Leo Hansmann, Brunangelo Falini, Cristina Mecucci, Enrico Tiacci, und Ralf Küppers.

Subclonal evolution of a classical Hodgkin lymphoma from a germinal center B-cell-derived mantle cell lymphoma.

Int J Cancer. 2014 Feb 15; 134(4):832-43.

Markus Schneider,* Stefanie Schneider,* Reina Zühlke-Jenisch, Wolfram Klapper, Christer Sundström, Sylvia Hartmann, Martin-Leo Hansmann, Reiner Siebert, Ralf Küppers, und Maciej Giefing.

Alterations of the CD58 gene in classical Hodgkin lymphoma.

Genes, Chromosomes and Cancer. 2015 Jun (im Druck)

* M.S. und S.S. teilen eine gemeinsame Koerstautorenschaft

7.2 Manuskript in Vorbereitung

Enrico Tiacci, Claudia Döring, Marc Weniger, Stefanie Schneider, Judith Arnolds, Sabrina Rüschenbaum, Janine Duppach, Marc Seifert, Martin-Leo Hansmann, und Ralf Küppers.

Characterization of human CD30⁺ B cells and their relationship to Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma.

7.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst herzlich bei Prof. Ralf Küppers für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit am Institut für Zellbiologie, für die sehr gute Betreuung und wissenschaftliche Unterstützung bedanken.

Danken möchte ich ebenfalls allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Küppers, für die schöne Zeit und sehr freundliche Arbeitsatmosphäre. Insbesondere danke ich den technischen Assistenten Sarah Taudien, Gwen Lorenz und Kerstin Heise für ihre praktische Unterstützung und die angenehme und freundschaftliche Zusammenarbeit. Bei Dr. Marc Seifert und Dr. Marc Weniger bedanke ich mich außerdem für die Sortierung der CD30⁺ B-Zellen und der Unterstützung während des CD30-Projektes.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich ebenfalls bei den Mitarbeitern unserer Kooperationsgruppen in Frankfurt am Main aus der Arbeitsgruppe von Prof. Martin-Leo Hansmann (Senckenbergisches Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main), in Kiel aus der Arbeitsgruppe von Prof. Reiner Siebert (Institut für Humangenetik, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) und in Perugia (Institut für Hämatologie, Universität von Perugia) insbesondere hier bei Dr. Enrico Tiacci bedanken.

Für die Bereitstellung der Tonsillen bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Hals-Nasen-Ohren Klinik des Universitätsklinikums Essen.

Außerdem möchte ich mich für die schöne und interessante Zeit bei den Mitgliedern des Graduiertenkollegs GK1045 „Modulation von Wirtszellfunktionen zur Behandlung viraler und bakterieller Infektionen“ bedanken.

Zuletzt danke ich Markus Schneider als Kollege für seine wissenschaftliche Unterstützung, vor allem für seine stetige Diskussionsbereitschaft sowie für die Bereitstellung der mikrodisezierten Zellen und WGA-Proben. Als meinem Partner und Ehemann danke ich ihm dafür, dass er an mich glaubt, mich bestärkt und mich jederzeit unterstützt.

7.4 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Einige der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden in enger Zusammenarbeit mit verschiedenen Kooperationsgruppen erzielt. Hierauf wird bei der Vorstellung der Ergebnisse an den entsprechenden Stellen hingewiesen.

7.5 Eidesstattliche Erklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat.- Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Analyse genetischer Läsionen im Hodgkin Lymphom und einem Kombinationslymphom sowie Charakterisierung humaner CD30-positiver B-Zellen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Stefanie Schneider befürworte.

Essen, den _____

Prof. Dr. Ralf Küppers

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat.- Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Stefanie Schneider

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat.- Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Stefanie Schneider